



# Contraintes mécaniques et microparticules endothéliales

Anne-Clémence Vion

## ► To cite this version:

Anne-Clémence Vion. Contraintes mécaniques et microparticules endothéliales. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05S012 . tel-00794158

**HAL Id: tel-00794158**

**<https://theses.hal.science/tel-00794158>**

Submitted on 25 Feb 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 5 – DESCARTES  
UNIVERSITE PARIS 7 - DIDEROT  
UNITE INSERM U970 – PARCC HEGP

2012

## THESE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 5

Ecole Doctorale : Biologie et Biotechnologie (B2T)

Discipline : Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et des Vaisseaux

Présentée et soutenue publiquement par

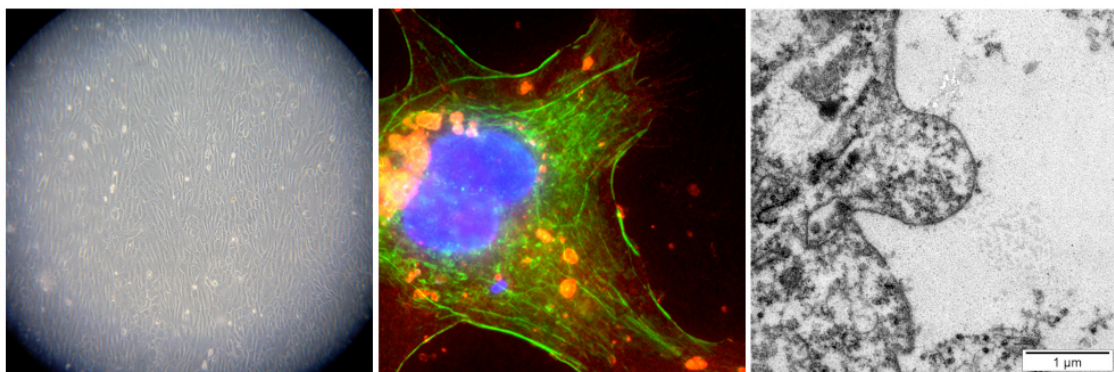
**Anne-Clémence VION**

**Le 28 Novembre 2012**

## CONTRAINTES MECANQUES ET MICROPARTICULES ENDOTHELIALES

*Thèse dirigée par :*

**Dr. Chantal M BOULANGER**



**Jury :**

Pr. Bernard Levy  
Pr. Abdul Barakat  
Dr. Christophe Dubois  
Dr. Carmen Martinez  
Dr. Chantal Boulanger

*Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse*

A François,

A mes parents,

## ***Remerciements***

.En premier lieu je tiens à remercier les membres de mon jury pour avoir évalué mon travail de thèse :

Le Professeur Abdul Barakat et le Docteur Christophe Dubois qui ont pris le temps d'examiner avec attention mon travail de thèse en tant que rapporteurs.

Le Docteur Carmen Martinez qui a acceptée d'être examinatrice de cette thèse.

Le Professeur Bernard Levy pour avoir accepté de présider cette thèse. Je souhaite également le remercier pour sa gentillesse et sa disponibilité durant ces trois années de thèse.

Le Docteur Chantal Boulanger pour avoir dirigé cette thèse et bien plus encore.



Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de cette thèse :

Le Dr Chantal Boulanger. Chantal, merci pour tout. Merci pour avoir eu confiance en moi, pour avoir toujours été disponible et accessible, pour savoir transmettre tes connaissances et compétences. Merci pour m'avoir formée durant ces trois années et m'avoir permis de m'épanouir pleinement dans ton équipe. Merci également pour tout tes conseils distillés judicieusement tout au long de mon parcours. Grâce à toi j'ai beaucoup appris scientifiquement mais aussi humainement. J'espère un jour pouvoir être, moi aussi, un chercheur de ton niveau.

Le Dr Alain Tedgui. J'ai été impressionnée dès le premier jour et le suis toujours. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour votre bonne humeur, votre gentillesse et vos conseils toujours avisés.

Pierre-Emmanuel Rautou. Mon « grand frère » de science... Merci pour ton ignorance en western blot, elle compense un peu tous tes autres talents scientifiques, médicales, techniques et humains. Merci pour m'avoir confié le projet autophagie pendant ton absence. Merci pour nos discussions scientifiques (mais pas que) sur un coin de bureau ou avec 6h de décalage horaire. J'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autre.

Cecile Devue. On partage beaucoup de points communs (mais je ne viens pas du « nord »). Tu es un des piliers de l'équipe et grâce à toi je me suis toujours senti à l'aise au labo. Ne change rien. J'espère, un jour, prendre ma revanche et te parler de mes soucis de nounous...

Jean-Marie Renard. Le nounours indomptable. Gentil, serviable, décalé (et pas que dans les horaires). Tes histoires incroyables me resteront en mémoire toute ma vie.

Xavier Loyer. Derrière ton caractère de cochon tu as un cœur énorme. Merci pour tous tes conseils, pour les manips ensemble, pour tes blagues de gastroentérologue (qui sont presque du niveau de Pierre-Emmanuel), pour les matins potins/café, pour ta compagnie certains samedi.

Bhama Ramkhelawon. Tu es la première avec qui j'ai travaillé au PARCC. Merci pour tout ce que tu m'a appris aussi bien techniquement que scientifiquement. Tu m'as aussi appris qu'on pouvait être sexy sous une blouse et en talon avec des surchausses.

Gilles Chironi. On ne se voit pas souvent mais sans toi ce travail n'aurait pas eu la même valeur. Merci aussi pour ta disponibilité. Nicolas Amabile. Le cardiologue de la bande, spécialiste du FACS et des multimarquages. Min Yin. Tu seras la prochaine à soutenir ta thèse dans l'équipe, je te souhaite le meilleur. Merci pour avoir partagé mon bureau pendant un an. Elisabeth Riant. Beaucoup de talents mais pas beaucoup de chance. J'espère que tu accepteras de refaire du FACS un jour. Isabelle Pic. Dernière arrivée de l'équipe, tu t'es déjà bien intégrée. J'espère que nous allons faire encore de belles choses ensemble sur le projet autophagie. Coralie Guérin. Merci pour tous les conseils de FACS, merci pour rire avec moi aux blagues de Xavier.

Je remercie aussi les étudiants « de passage » dans notre laboratoire et qui m'ont donné de bons coups de main sur mes manip : Emmanuelle, Mélanie, Lamia, Claire, Thibaut.

Je tiens aussi à remercier les équipes du deuxième étage qui contribuent toutes à la bonne ambiance au laboratoire :

L'équipe « reins » (ou « glomérul-gang ») ; Pierre-Louis tharaux avec qui c'est toujours un plaisir de discuter et de danser le rock, Carole et Olivia, nous avons des galères communes de souris, Mickael (j'espère que tu es allé chez le coiffeur pour ma thèse), Imane, Vincent, Berengère, Léa, Marine même si elle n'est plus la...

L'équipe « angiogenèse » ; Jean-Sébastien Silvestre fan de cloclo, José (monsieur Western Blot/qPCR), Adèle ma copine de thèse, Kiave (future femme de Xavier...ou pas), Yasmine, Alice, Clément, Wineke.

L'équipe « immunité » ; Ziad Mallat, Stéphane pour son journal club et notre passion commune pour les Delacres périmés, Charlotte, Soraya, Padma, Melissa, Safa, Hafid le tombeur imaginaire, Jérémie son padawan, ludivine, Bruno (monsieur souris/jean-jacques Goldman).

Les ex-labo 218 ; Christophe Heymes, Marie, Yanis, Caro, Pauline (ma deuxième copine de thèse).

Les futurs membres de l'équipe 1 : Olivier Blanc-Brude et Dominique Charue. Stéphane Camus qui nous a quitté pour la « west coast ».

Micheline pour tes conseils en microscopie à fluorescence et pour veiller sur notre sécurité.

Je remercie aussi l'ensemble des habitants des 3 étages du PARCC en particulier Sonia, Juliette et Julie.

Je remercie également le personnel du pôle administratif qui nous permet de faire notre travail dans de bonnes conditions en particulier Philippe Coudol, Véronique pour qui nous sommes ses petits poussins, Martine qui connaît tout les rouages des contrats de travail, Annette qui nous permet de partir en vacances, pardon, en congrès...

Je remercie l'ERI et Elisabeth pour prendre soin de nos souris et savoir gérer la réception de 15 mails minute.

Enfin je remercie tous mes proches sans qui cette thèse n'aurait pas existée :

François, mon infographiste-cuisinier personnel. Tu as participé à cette thèse plus que tu ne le crois. Merci pour ton soutien quotidien, ta présence à mes cotés, ton humour, ton amour.

Mes parents. Les livres de bio « pleins de jolies images » qui ont toujours été à portée de main et les élevages de grillons ne sont certainement pas innocents dans cette affaire. Merci de m'avoir élevé comme vous l'avez fait.

Ma « grande - petite » sœur.

Mes grand-Parents. Mes tantes, Sylvie et Elisabeth pour leurs conseils pré-thèse.

Mes amis les plus proches : Céline, Estelle, Berangère (une dédicace spéciale : la seule non scientifique que je connaisse qui ai lu ma thèse en entier, merci pour les corrections), Marion, Alice, Romain.

Et également Dominique, Anne-Marie, Julien et Maïra.

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Sommaire</b>	<b>6</b>
<b>Abréviations</b>	<b>8</b>
<b>Tables des illustrations</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>A. L'endothélium</b>	<b>12</b>
<i>A.1. L'endothélium : constituant du vaisseau</i>	12
A.1.1. Structure de l'arbre vasculaire	12
A.1.2. Les Artères	13
A.1.3. Les capillaires	15
<i>A.2. La physiologie de l'endothélium</i>	17
A.2.1. Fonction 1 : control du tonus artériel	17
A.2.2. Fonction 2 : maintien de l'hémostase	21
A.2.3. Fonction 3 : Diapédèse leucocytaire	22
<i>A.3. L'endothélium : senseur mécanique du vaisseau</i>	23
A.3.1. Cellules endothéliales et étirement cyclique	23
A.3.2. Cellules endothéliales et contraintes de cisaillement	27
A.3.3. La mécanotransduction des contraintes de cisaillement	34
A.3.4. Contraintes de cisaillement physiologiques et fonctions endothéliales	37
<i>A.4. L'endothélium : Réponses pathologiques, cas de l'athérosclérose</i>	40
A.4.1. L'athérosclérose : définition	40
A.4.2. Les facteurs de risque	40
A.4.3. L'activation endothéliale	42
A.4.4. Les étapes majeures de l'athérosclérose	46
<b>B. Les microparticules</b>	<b>49</b>
<i>B.1. Définition et Détection</i>	49
B.1.1. Cytométrie en flux	51
B.1.2. Capture en phase solide	53
B.1.3. Microscopie électronique à transmission	54
B.1.4. Microscopie à force atomique	55
B.1.5. Spectroscopie de corrélation photonique (« dynamic light scattering »)	56
B.1.6. ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)	56
<i>B.2. Origines, Formation et Contenu</i>	58
B.2.1. Formation des microparticules	58
B.2.2. Les mécanismes de production des microparticules endothéliales	62
B.2.3. Contenu des microparticules	65
B.2.4. Caractéristiques des microparticules endothéliales	66
<i>B.3. Clairance des microparticules</i>	68
<b>C. Microparticules, Endothélium et Athérosclérose</b>	<b>71</b>
<i>C.1. Microparticules et traitements cardiovasculaires</i>	71
<i>C.2. Effets des microparticules dans l'athérosclérose</i>	72
C.2.1. Les microparticules circulantes	72
C.2.2. Les microparticules de plaques	75
C.2.3. Les microparticules endothéliales	77
<i>C.3. Microparticules et chronologie de l'athérosclérose</i>	82
<i>C.4. Microparticules endothéliales et valeur pronostique</i>	88

<b>TRAVAUX DE THESE</b>	<b>90</b>
<b>A. Objectifs – Hypothèses de travail</b>	<b>91</b>
<b>B. Méthodes Principales</b>	<b>92</b>
<i>B.1. Culture cellulaire</i>	92
<i>B.2. Dosage des microparticules</i>	98
<i>B.3. Analyse des voies de signalisation intracellulaire</i>	102
<b>C. Résultats</b>	<b>104</b>
<i>C.1. Travaux 1 : Etirement cyclique et microparticules endothéliales</i>	104
<i>C.2. Travaux 2 : Contraintes de cisaillement et microparticules endothéliales</i>	122
<i>C.3. Travaux 3 : Contenu des microparticules endothéliales</i>	154
<i>C.4. Travaux 4 : MicroARN, microparticules endothéliales et condition pro-athérogène</i>	160
<i>C.5. Travaux 5 : Microparticules, transfert d'ICAM1 et recrutement monocytaire</i>	164
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>186</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>228</b>
Curriculum vitae	228

## ***Abréviations***

ABC : « ATP-binding protein »	RANTES : protéine « regulated and normal T cell expressed and secreted »
ADN : acide désoxyribonucléique	ROCK : « Rho associated kinase »
AMP : adenosine monophosphate	ROS : espece réactive de l'oxygène
AMPK : « adenosine monophosphate activated kinase »	SREBP : « Sterol Regulatory Element-Binding Proteins »
ApoE : apolipoprotéine E	SS : « side scatter »
ARN : acide ribonucléique	TACE : enzyme de conversion du TNFa
CD : cluster de différenciation	TBH4 : tétrabioptérine
COS : cellules fibroplastiques dérivées de reins de singe	TF : facteur tissulaire
COX : cyclo-oxygénase	TGF : facteur de croissance tumoral
CRP : protéine réactive C	TNF : facteur de nécrose tumoral
Cx : connexine	tPA : activateur tissulaire du plasminogène
CXCL12 : SDF-1 « stromal cell-derived factor-1 »	TRAF : « TNF receptor associated factors »
CXCR4 : recepteur membranaire de SDF-1	TRAIL/Apo2L : « TNF-related apoptosis-inducing ligand »
DAPK : « death associated protein kinase »	uPA : urokinase
DEL : « developmental endothelial locus »	VCAM : « vascular cell adhesion molecule »
EDRF : facteur dérivé de d'endothélium	VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique	VEGFR : recepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial
ERK : « extracellular signal-regulated kinase »	
FAK : kinase d'adhésion focale	
FITC : fluorescein isothiocyanate	
FS : « forward scatter »	
GMP : guanosine monophosphate	
GTP : guanosine triphosphate	
Hsp : « heat shock protein »	
HSS : « high shear stress »	
ICAM : « intercellular adhesion molecule »	
IL : interleukine	
JAM : « junctional adhesion molecule »	
JNK : « c-jun n-terminal kinase »	
KLF : « kruppel like factor »	
LDL : lipoprotéine de faible densité	
LPS : lipopolysaccharides	
LSS : « low shear stress »	
MAPK : « mitogen associated protein kinase »	
MCP : « Monocyte chemoattractant protein »	
MEC : matrice extra-cellulaire	
MEK : kinase de ERK	
MEKK : kinase de la kinase de ERK	
MLC : chaine legere de myosine	
MMP : métaloprotéinase de matrice	
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	
NFkB : facteur nucléaire kappa B	
NO : monoxyde d'azote / oxyde nitrique	
NOS : synthétase d'oxyde nitrique	
oxLDL : LDL oxydées	
PAI : inhibiteur d'activateurs de plasminogène	
PDGF : facteur de coissance dérivé des plaquettes	
PE : Phycoerythrine	
PECAM : « platelet endothelial cell adhesion molecule »	
PG : prostaglandine	
PGI2 : prostacycline	
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase	
PK : protéine kinase	
PLA2 : phospholipase A2	
PS : phosphatidylsérine	
PSR : récepteur de la phophatidylsérine	

## Tables des illustrations

Figure 1 : Arbre Vasculaire chez l'homme.....	12
Figure 2 : Structure des artères (issue de Sanofi-aventis) .....	13
Figure 3 : Structure des capillaires .....	15
Figure 4 : Structure des veines (issue de Sanofi-aventis).....	16
Figure 5 : Les différents agents vasoconstricteur et vasodilatateurs produits par l'endothélium.....	20
Figure 6 : Effets de l'étirement excessif au niveau vasculaire (adapté de Birukov 2009 <sup>37</sup> ) .....	26
Figure 7 : Cellules endothéliales soumises à différentes contraintes de cisaillement (physiologiques ou non) .....	28
Figure 8 : Modification des contraintes de cisaillement en fonction de la géographie de l'arbre vasculaire (d'après Chatzizisis 2007 <sup>75</sup> ).....	28
Figure 9 : Flux laminaire et turbulent : le nombre de Reynolds (d'après chatzizisis 2007 <sup>75</sup> ) .....	29
Figure 10 : Mécanismes d'action de PECAM-1 et du complexe PECAM-1/Ve-Cadherine/VEGFR2.....	31
Figure 11 : microscopie électronique d'un capillaire après marquage du glycocalyx.....	32
Figure 12 : Schéma récapitulatif des différents mécanosenseurs.....	33
Figure 13 : Mécanismes de production de NO sous fortes contraintes de cisaillement et effets du NO .....	36
Figure 14 : Mécanismes intracellulaire activés par les faibles contraintes de cisaillement et leurs effets.....	45
Figure 15 : Progression de la plaque d'athérosclérose (adaptée de wikimedia) .....	47
Figure 16 : Plaque stable et plaque instable (adaptée de Webb et al. 2008 <sup>432</sup> ) .....	48
Figure 17 : Détection et analyse des microparticules par Cytométrie en flux.....	52
Figure 18 : Exemple de microparticules observées en microscopie électronique à transmission (Burger et al, 2011 <sup>56</sup> ) .....	54
Figure 19 : Exemple de microparticules observées en microscopie à force atomique (leong et al, 2011 <sup>230</sup> ) .....	55
Figure 20 : Diagramme de la répartition des origines microparticulaires retrouvées dans le sang (Leroyer et al. 2007 <sup>233</sup> ) .....	58
Figure 21 : Mécanismes d'externalisation de la phosphatidylsérine (adapté de huguel 2005 <sup>192</sup> ) .....	60
Figure 22 : Mécanismes de production de microparticules endothéliales sous stimulation par la thrombine, le TNFa et l'angiotensine II (adapté de Leroyer 2010) .....	64
Figure 23 : molécules impliquées dans la clairance des microparticules.....	69
Figure 24 : Diagramme des origines cellulaires des microparticules de plaque d'athérosclérose (Leroyer et al, 2007 <sup>233</sup> ) .....	75
Figure 25 : Effets délétères des microparticules endothéliales (adapté de Amabile et al, 2010 <sup>16</sup> ).....	79
Figure 26 : Effet des microparticules en fonction de leur contenu.....	81
Figure 27 : Etape 1, dysfonction endothéliale (adaptée de Rautou et al 2011 <sup>336</sup> ) .....	82
Figure 28 : Etape 2, recrutement et progression (adaptée de Rautou et al 2011 <sup>336</sup> ) .....	83
Figure 29 : Etape 3, progression et fragilisation (adaptée de Rautou et al 2011 <sup>336</sup> ).....	85
Figure 30 : Etape 4, rupture et thrombose (adaptée de Rautou et al 2011 <sup>336</sup> ) .....	86
Figure 31 : Mécanisme de génération des contraintes de cisaillement.....	93
Figure 32 : Efficacité de la transfection du siRNA ABCA1.....	96
Figure 33 : Efficacité de la surexpression de RhoA constitutivement active.....	97
Figure 34 : Définition de la zone microparticulaire en cytométrie de flux.....	98
Figure 35 : Effet de l'ajout d'EDTA sur le marquage non spécifique .....	100
Figure 36 : Marquage CD144 de microparticules générées in vitro.....	100
Figure 37 : analyse de la composition du culot microparticulaire obtenu après centrifugation .....	101
Figure 38 : Analyse de la variation de fluorescence des microparticules, représentative du taux de phosphatidylsérine externalisé. ....	155
Figure 39 : Méthode d'analyse avec le GALLIOS.....	156
Figure 40 : Analyse et quantification des microparticules par utilisation du GALLIOS.....	157
Figure 41 : Expression d'ICAM-1 sur les microparticules endothéliales générées sous différentes contraintes de cisaillement.....	159
Figure 42 : Quantification des microARN présent dans les microparticules en fonction des contraintes de cisaillement.....	161
Figure 43 : Effet d'un traitement par les LDL oxydés sur la production de microparticules endothéliales.....	162
Figure 44 : Effet des LDL oxydés sur l'emballage des microARN.....	162
Figure 45 : Mécanisme d'action de l'étirement sur la production de microparticules endothéliales.....	187
Figure 46 : Mécanismes d'action des contraintes de cisaillement sur la production de microparticules endothéliales .....	189
Figure 47 : Composition des microparticules obtenues sous différentes contraintes de cisaillement.....	193
Figure 48 : Effet des microparticules de plaque sur le recrutement monocyttaire .....	194

<i>Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de vésicules extra-cellulaires (adapté de Mause and Weber 2010 <sup>268</sup>)</i> .....	50
<i>Tableau 2 : Antigènes utilisés pour la reconnaissance des microparticules</i> .....	52
<i>Tableau 3 : Caractéristiques de chaque mode de détection des microparticules</i> .....	57
<i>Tableau 4 : Stimuli reconnus pour activer la production de microparticules par les cellules circulantes et de la paroi vasculaire (adapté de Raout et al. 2011<sup>336</sup>)</i> .....	62
<i>Tableau 5 : Liste des agents pharmacologiques utilisés (DMSO = diméthyl sulfoxide)</i> .....	95
<i>Tableau 6 : Liste des siRNA et plasmides utilisés</i> .....	95
<i>Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en western blot</i> .....	102
<i>Tableau 8 : Séquences des amorces qPCR</i> .....	103



# Introduction

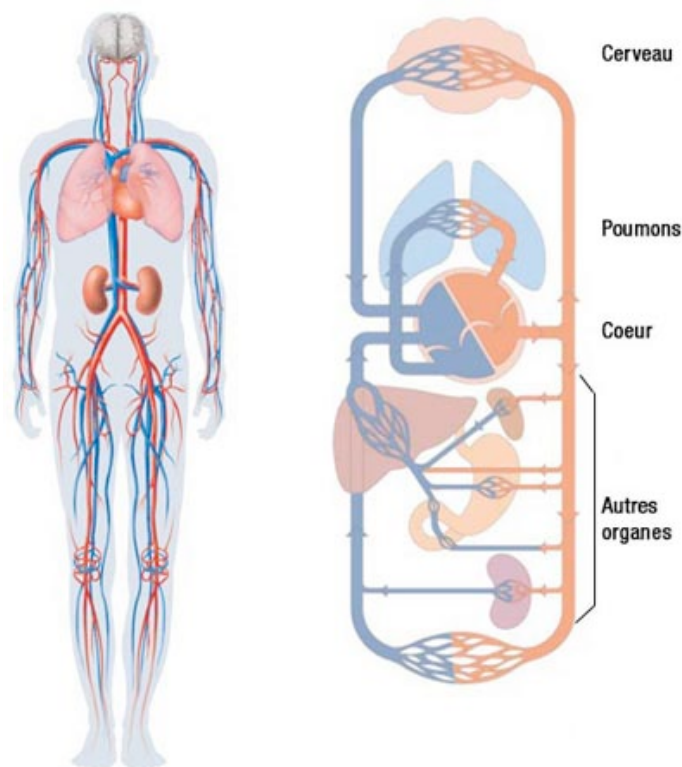
## ***A. L'endothélium***

### ***A.1. L'endothélium : constituant du vaisseau***

#### **A.1.1. Structure de l'arbre vasculaire**

Les vaisseaux sanguins sont présents dans l'ensemble de notre organisme, formant un réseau appelé « arbre vasculaire ». Cet arbre va permettre la circulation du sang oxygéné du cœur vers les autres organes puis retourne le sang pauvre en oxygène et riche en CO<sub>2</sub> vers le cœur puis le poumon (Figure 1).

Bien plus qu'un simple réseau de tuyauterie, cet arbre vasculaire a de nombreux rôles physiologiques. Il est possible d'identifier trois grands groupes de vaisseaux : les vaisseaux de la macro-circulation artérielle, de la macro-circulation veineuse et de la microcirculation. Bien qu'ayant des caractéristiques communes, ces vaisseaux présentent des différences du point de vue structural et fonctionnel selon leur rôle et leur localisation dans le corps.



**Figure 1 : Arbre Vasculaire chez l'homme**  
Présentation dans l'organisme et schéma de circulation

### A.1.2. Les Artères

Les artères constituent un réseau arborescent. Les parois de ces vaisseaux sont épaisses, élastiques et pourvues d'une couche musculaire. Les artères sont composées de trois couches concentriques de cellules <sup>279</sup> (Figure 2) :

- L'adventice : couche la plus externe, constituée de fibres de collagène, d'élastine et d'adipocytes.
- La média : composée de cellules musculaires lisses (plus ou moins abondantes en fonction du diamètre du vaisseau), de collagène et d'élastine. Cette couche est limitée par deux limitantes élastiques, l'une interne, l'autre externe.
- L'intima : constituée d'un monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et un tissu conjonctif lâche. Ce sont ces cellules qui vont être en contact direct avec le sang circulant.

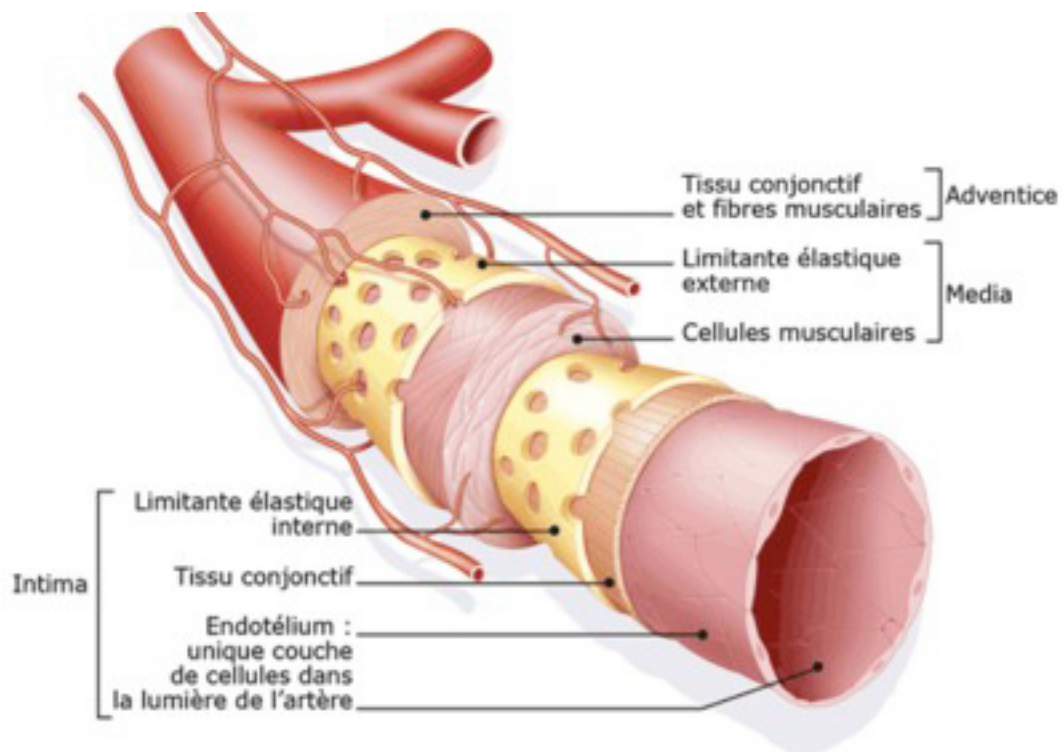


Figure 2 : Structure des artères (issue de Sanofi-aventis)

Le rôle principal des artères est de distribuer le sang éjecté à haute pression par le cœur vers la périphérie du corps. Elles ont donc trois grandes fonctions :

- Elles amortissent les oscillations de pression et de débit dues aux battements cardiaques pour régulariser l'écoulement dans les capillaires
- Elles canalisent le sang oxygéné
- Elles le poussent vers les artérioles

Pour parvenir à cela, elles ont une capacité de contraction/dilatation régulée grâce à des systèmes hormonaux et nerveux. Elles jouent un rôle essentiel dans le maintien de la pression sanguine. Grâce à la couche de cellules musculaires lisses, elles modulent l'état de tension du vaisseau et régulent de ce fait la pression artérielle. Ces vaisseaux sont aussi le siège de diverses pathologies, en particulier l'athérosclérose (décrite plus en détail en fin de chapitre). Il existe deux types d'artère : *les artères de conductance*, de gros calibre et dont le rôle est essentiellement hydraulique ; *les artères de résistance*, qui régulent la distribution sanguine en volume et pression au niveau des capillaires.

Les artères peuvent également être distinguées en *artères systémiques* qui transportent le sang riche en oxygène vers la périphérie et en *artères pulmonaires* qui transportent le sang pauvre en oxygène vers la microcirculation des poumons.

### A.1.3. Les capillaires

Ces vaisseaux sont la continuité du réseau artériel dans un sens et le début du réseau veineux dans l'autre sens si l'on suit la circulation sanguine. Ce sont les plus petits vaisseaux de l'organisme avec un diamètre aux alentours de  $10\mu\text{m}$ .

La paroi des capillaires est composée d'une monocouche de cellules endothéliales entourée d'une membrane basale (Figure 3). En fonction de la structure du réseau endothélial, on peut distinguer trois types de capillaires :

- les capillaires continus, dont les cellules endothéliales sont jointives ; ils sont présents dans les muscles, les tissus conjonctifs et les poumons.
- les capillaires fenestrés, dont l'endothélium présente des pores de  $70\text{nm}$  ; ils sont présents dans l'intestin grêle, les reins et le cerveau.
- les capillaires sinusoides, où l'endothélium présente des pores de  $1\text{ à }3\mu\text{m}$  ; la membrane basale est parfois absente ; ils sont présents dans le foie, la rate et les os.

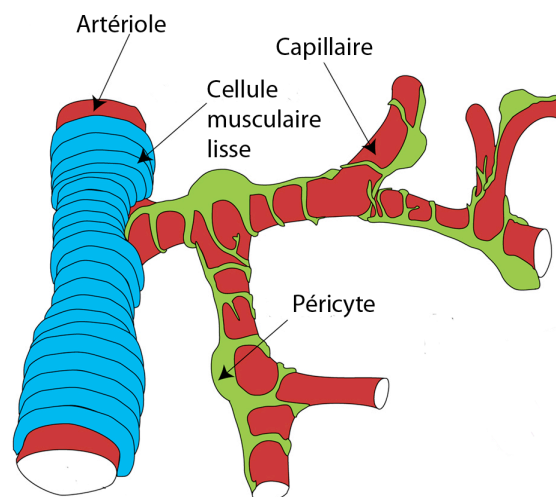


Figure 3 : Structure des capillaires

De par leur structure, ces vaisseaux sont souples et élastiques mais également fragiles. On retrouve également le long de ces capillaires les péricytes qui entourent le vaisseau par des prolongements circonférentiels. Les péricytes ont la capacité de se contracter ce qui leur permet d'intervenir dans le débit sanguin des capillaires. Ils jouent également un rôle de stabilisateur du vaisseau, participent à la perméabilité et à l'angiogenèse.

#### A.1.4. Les veines

Les veines canalisent le retour du sang au cœur. Elles ont un plus grand diamètre interne que les artères qui leur correspondent. Chez les mammifères, environ 50% du volume total du sang est contenu dans les veines, ce qui leur donnent un rôle de stockage du sang. De plus, les pressions appliquées sont 90% moins importantes que la pression artérielle.

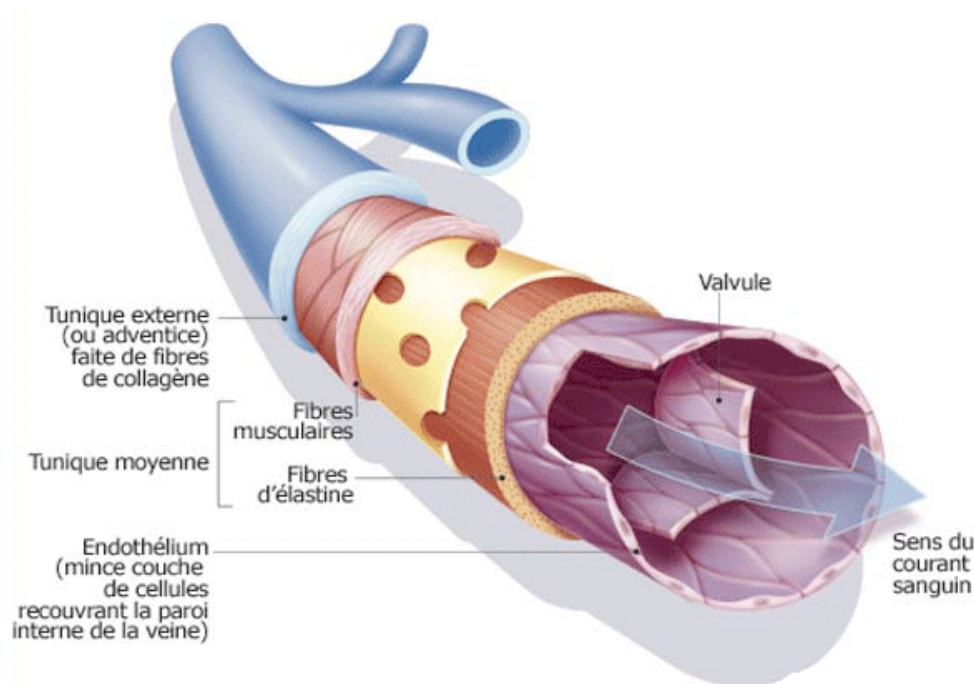


Figure 4 : Structure des veines (issue de Sanofi-aventis)

Tout comme les artères, les veines sont composées de trois couches : adventice, média et intima. Il n'y a pas de limitante élastique contrairement aux artères, cependant les veines contiennent des valvules qui imposent le sens de circulation du sang et empêchent les retours (Figure 4). De plus, les parois des veines sont plus fines, contiennent moins de cellules musculaires lisses, et moins de fibres de collagène que de fibres élastiques. De ce fait, les veines peuvent subir des étirements importants, elles sont plus élastiques que les artères, leur compliance (capacité d'augmentation du diamètre pour une pression donnée) est également plus importante que les artères.

## ***A.2. La physiologie de l'endothélium***

L'endothélium vasculaire n'est pas une simple barrière anatomique entre le sang circulant et les cellules musculaires lisses, il joue un rôle important dans la régulation de différents paramètres physiologiques comme l'hémostase, le transport des métabolites, l'angiogénèse et le contrôle du tonus vasculaire <sup>400</sup>. Quel que soit le diamètre de la paroi, il y a toujours une seule couche de cellules endothéliales. Histologiquement, l'endothélium constitue 1% de la masse corporelle totale et couvre une surface estimée à 28 m<sup>2</sup> pour les artères et de 280 m<sup>2</sup> pour la microcirculation<sup>21</sup>. Les cellules endothéliales sont très hétérogènes du point de vue de leur phénotype en fonction de leur localisation dans l'arbre vasculaire. De manière générale, les cellules endothéliales sont de forme aplatie d'environ 2µm d'épaisseur <sup>89</sup>. Elles possèdent également de nombreuses organelles caractéristiques d'une cellule sécrétrice.

L'hétérogénéité morphologique de l'endothélium peut être illustrée par la comparaison des endothéliums capillaires et artériels. L'endothélium capillaire est très perméable avec des pores allant de 70nm à 3µm. De plus, une cellule endothéliale couvre à elle seule la périphérie du vaisseau formant ainsi un tube dans lequel le sang circule. Enfin ces cellules sont particulièrement riches en cavéoles <sup>303</sup>. Ces structures membranaires sont riches en cholestérol, en glycosphingolipides/sphingomyeline, et en protéines dont la cavéoline, elles participent entre autre au transport de grosses molécules à travers la paroi. Les cellules endothéliales artérielles, quant à elles, présentent une organisation pavimenteuse sur la paroi artérielle. La physionomie exacte de la cellule (prismatique ou fusiforme) dépendra essentiellement des contraintes de cisaillement appliquées localement (voir chapitre suivant). Leur perméabilité est faible et elles présentent peu de cavéoles <sup>104</sup>.

### **A.2.1. Fonction 1 : control du tonus artériel**

Le tonus artériel est l'état de contraction ou de relâchement de la paroi musculaire des artères. Il existe différents mécanismes qui régulent la balance entre vasoconstriction et vasodilatation (Figure 5).

Les signaux permettant une contraction ou un relâchement peuvent provenir de l'adventice ou de l'intima <sup>140</sup>. Les signaux provenant de l'adventice sont surtout

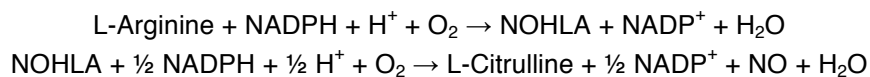
vasoconstricteurs (catécholamine, angiotensine II). Les signaux issus du flux sanguin ou de la cellule endothéliale sont divers et peuvent être vasoconstricteurs ou vasodilatateurs. La cellule endothéliale en elle-même produit la plupart de ces facteurs suite à différentes stimulations.

- la prostacycline  $\text{PGI}_2$ :

Cette molécule est un agent vasodilatateur découvert en 1976 <sup>53</sup>. Il est synthétisé au niveau endothélial par la cyclo-oxygénase-1 (COX-1). Les phospholipides membranaires vont être utilisés par la phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) pour produire de l'acide arachidonique substrat de la COX-1 <sup>172</sup>. La production de prostacycline est activée par l'hypoxie, les contraintes de cisaillement ainsi que par la bradykinine, l'histamine et la thrombine. Elle est également dépendante de la concentration intracellulaire de calcium. Au niveau des cellules musculaires lisses, la prostacycline va se fixer sur son récepteur à 7 domaines transmembranaires, augmenter la production d'AMP cyclique conduisant à une activité de la PKA induisant une relaxation <sup>368</sup>. En plus de son effet vasodilatateur, elle est également inhibitrice de l'agrégation plaquettaire aussi bien sur les cellules endothéliales que musculaires lisses <sup>178,218</sup>, elle a une action anti-thrombotique <sup>430</sup> et anti-proliférative au niveau des cellules musculaires lisses <sup>306,357</sup>.

- le monoxyde d'azote (NO) :

Le NO est un vasodilatateur connu depuis 1980 <sup>146</sup> mais alors seulement identifié comme "facteur de relaxation dérivé de l'endothélium" (EDRF). Le NO, la molécule responsable des effets observés, sera seulement identifié en 1986 <sup>332</sup>. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthétase (NOS) à partir de la L-arginine selon les réactions suivantes :



Cette réaction nécessite un cofacteur essentiel, la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ). La citrulline, produite en même temps que le NO, peut être recyclée en L-arginine au niveau cellulaire. La L-arginine provient donc à la fois d'un renouvellement et d'un apport exogène par l'alimentation.

Il existe différents types de NOS : la NOS endothéliale et la NOS neuronale (NOS 3 et 1) exprimées de manière constitutive et activable de manière calcium dépendante ; et la NOS inductible (NOS 2) produite uniquement sous certains



stimuli et produisant du NO de manière constitutive.

La NOS endothéliale (eNOS) est la forme exprimée principalement dans les cellules endothéliales. Elle peut être modulée au niveau de son activité <sup>46,62</sup> et de son expression <sup>19</sup> par différents facteurs comme des molécules circulantes (bradykinine, thrombine, sérotonine...) ou par des co-facteurs. L'activation de cette NOS peut être dépendante ou indépendante du calcium. L'activation indépendante du calcium est médiée par les contraintes de cisaillement et sera présentée dans le chapitre dédié à la mécanotransduction. Brièvement, dans des conditions d'augmentation du calcium intracellulaire, la eNOS préalablement associée à la cavéoline au repos va se dissocier pour se lier au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline et à Hsp90 pour être phosphorylée et devenir active <sup>138</sup>.

Le NO a différents rôles en plus de son effet vasodilatateur, il limite la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, diminue également la synthèse de protéines de matrice <sup>343</sup>, limite l'adhésion plaquettaire et leucocytaire ainsi que l'agrégation plaquettaire. Dans le lumen, le NO joue également un rôle dans la fluidité du sang <sup>343</sup>.

- les dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique :

L'acide arachidonique peut être transformé en prostaglandine  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) par la COX-1 en plus de la formation de  $\text{PGI}_2$  <sup>172</sup>. La  $\text{PGH}_2$ , le thromboxane  $\text{A}_2$  (produit dérivé des  $\text{PGH}_2$ ) et les endopéroxydes (métabolites intermédiaires) ont une action vasoconstrictrice <sup>20,192</sup>. Il faut cependant noter que dans les conditions physiologiques, la production de ces agents est moins importante que la production de  $\text{PGI}_2$  par la COX-1. Ainsi l'effet de ces facteurs n'est pas visible en comparaison aux effets vasorelaxant du NO et de la  $\text{PGI}_2$ . Bien que connue pour son rôle vasorelaxant, la  $\text{PGI}_2$  est également capable d'induire la contraction des cellules musculaires lisses <sup>229,323</sup>. Cela est dû à l'interaction (faible mais existante) de la  $\text{PGI}_2$  avec le récepteur au thromboxane présent sur les cellules musculaires lisses, la contraction induite est de faible amplitude et de courte durée <sup>155</sup>.

- l'endothéline (ET1) :

Ce peptide est l'un des plus puissants vasoconstricteurs endogènes connus. L'endothéline existe sous 3 isoformes (ET1 à ET3) mais seule ET1 joue un rôle dans

le tonus vasculaire <sup>207</sup> permettant le maintien du tonus basal. La production d'ET1 est augmentée par des stimuli pro-inflammatoires comme l'interleukine (IL)-1 ou la thrombine mais aussi par l'adrénaline, la vasopressine ou encore les catécholamines <sup>342,435</sup>. L'ET1 peut se lier à deux récepteurs : ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub>. ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, exprimés au niveau de la cellule musculaire lisse, ont un rôle vasoconstricteur. ET<sub>B</sub>, présent au niveau de la cellule endothéliale a un rôle vasodilatateur car il induit la production de NO et de PGI<sub>2</sub> localement <sup>254</sup> et peut permettre une relaxation transitoire du vaisseau.

- les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :

Les ROS sont produits par différentes enzymes dans la cellule endothéliale : les NOS, la xanthine oxydase, la NADPH oxydase ou encore la COX suite à différentes stimulations telles que le cisaillement endothélial ou la bradykinine <sup>356</sup>. Toutes ces enzymes conduisent à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub><sup>-</sup> <sup>401,441</sup>. Ces ROS vont alors interagir avec le NO et former des péroxynitrites ; il se produit alors une perte de la biodisponibilité du NO, réduisant ainsi ses effets vasorelaxants <sup>209,332</sup>. Ces ROS peuvent aussi avoir un effet contractant direct sur les cellules musculaires lisses <sup>206</sup>.

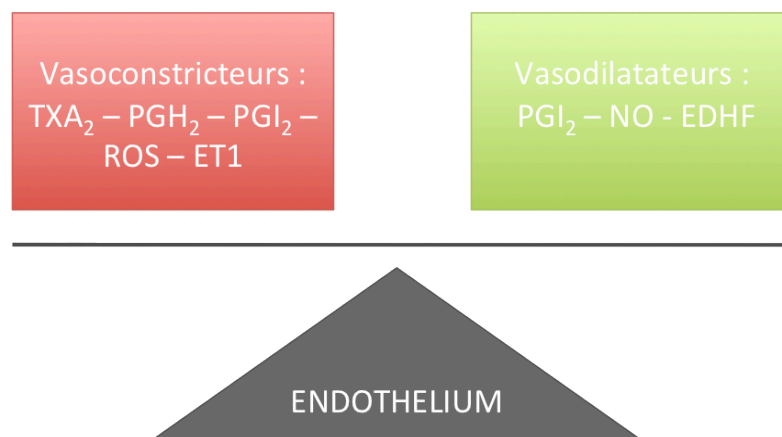


Figure 5 : Les différents agents vasoconstricteur et vasodilatateurs produits par l'endothélium

## A.2.2. Fonction 2 : maintien de l'hémostase

L'hémostase peut être définie comme l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux, soit arrêter les hémorragies et empêcher les thromboses <sup>129,373</sup>.

On distingue classiquement trois temps :

Premièrement, l'hémostase primaire ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc". Puis la coagulation consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrines emprisonnant des globules rouges (thrombus rouge). Enfin, la fibrinolyse permet la destruction des caillots, ou la limitation de leur extension.

L'endothélium participe activement à cette hémostase, tout d'abord en empêchant la formation de caillot dans les vaisseaux en condition physiologique puis en activant la cascade de coagulation lorsque la paroi est lésée.

En conditions normales, l'endothélium est doté de propriétés anti-plaquettaires, anti-thrombotiques et pro-fibrinolytiques et inhibe l'agrégation plaquettaire grâce notamment à son intégrité et à la sécrétion de prostacycline (qui est un puissant agent inhibiteur de l'agrégation plaquettaire en plus d'être vasodilatateur et anti-thrombotique). La cellule endothéliale saine exprime aussi sur sa membrane la thrombomoduline qui s'oppose à la formation de thrombine.

Après lésion, les cellules endothéliales expriment un facteur d'adhérence pour les plaquettes : le facteur Von Willebrand (vWf) qui va assurer l'interaction entre les plaquettes et la paroi du vaisseau lésé. L'endothélium exprime aussi le facteur tissulaire amorçant la formation de thrombine.

De plus, les cellules endothéliales interviennent aussi dans le dernier processus d'hémostase : la fibrinolyse. La dissolution du caillot est prise en charge majoritairement par la plasmine, une enzyme présente dans le sang sous forme de plasminogène. Deux facteurs endothéliaux induisent la transformation du plasminogène en plasmine : le tPA (activateur tissulaire de plasminogène) et l'uPA (urokinase). Le tPA est faiblement exprimé à l'état basal, sa synthèse est augmentée plusieurs jours après le début de la lésion. La plasmine ainsi produite détruit la fibrine et dissocie la matrice extra-cellulaire permettant une dégradation du caillot.

La cellule endothéliale produit également les protéines PAI-1 et PAI-2 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) permettant de stopper l'action de tPA. Cela permet d'avoir une balance de régulation fine de la lyse au niveau local.

### **A.2.3. Fonction 3 : Diapédèse leucocytaire**

La diapédèse est le mécanisme par lequel un leucocyte traverse la couche endothéliale d'un vaisseau pour rejoindre le lieu de l'inflammation <sup>278</sup>. Ce mécanisme a lieu en réponse à des signaux pro-inflammatoires qui vont non seulement être perçus par les leucocytes mais qui vont également activer l'endothélium permettant l'expression de molécules d'adhésion à leur surface dont les sélectines, les intégrines et les molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Cela permettra la reconnaissance entre les cellules endothéliales et les leucocytes, puis le roulement (selectines) et l'adhésion (intégrines), enfin le leucocyte transmigrera à travers la barrière endothéliale. Chaque étape est sous le contrôle spécifique d'une ou de l'association de plusieurs de ces molécules.

La transmigration peut se faire de deux manières : soit le leucocyte s'extravase au niveau des jonctions cellulaires grâce à la dissociation locale et temporaire du système de jonction (migration paracellulaire), soit le leucocyte traverse la cellule endothéliale grâce à l'ouverture d'un « trou » au niveau du cytoplasme (migration transcellulaire). Ces deux phénomènes utilisent des molécules communes (PECAM, ICAM1, CD99) mais aussi des molécules spécifiques comme JAM-A, impliquées uniquement dans la migration paracellulaire <sup>248</sup>.

### ***A.3. L'endothélium : senseur mécanique du vaisseau***

Le flux sanguin génère trois types de forces hémodynamiques sur les vaisseaux : la pression, l'étirement cyclique et les contraintes de cisaillement.

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont « équipées » pour traduire ces signaux extérieurs en messages intracellulaires permettant une réponse aussi bien cellulaire que tissulaire et différente en fonction du temps d'exposition aux stimuli. Les cellules musculaires lisses, elles, sont uniquement capables de ressentir la pression et l'étirement.

#### **A.3.1. Cellules endothéliales et étirement cyclique**

Tout d'abord, il est important de noter que les cellules endothéliales peuvent être soumises à deux sortes d'étirements cycliques : l'étirement dû à la pression et à la pulsatilité du sang se produisant dans les gros vaisseaux et l'étirement cyclique dû à la respiration, ce dernier affecte uniquement les cellules endothéliales pulmonaires mais joue un rôle majeur dans sa physiologie et sa physiopathologie.

Physiquement, l'étirement des cellules résulte d'une augmentation de la tension pariétale basale appliquée sur le vaisseau en réponse à une augmentation de pression transmurale (différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur du vaisseau). La tension pariétale peut être calculée grâce à la loi de Laplace :

$$T = (P_i - P_e) \times R$$

Où « T » est la tension pariétale, « P<sub>i</sub> » la pression interne, « P<sub>e</sub> » la pression externe et « R » le rayon du vaisseau. Il est à noter que la tension pariétale, nécessaire au maintien d'une pression transmurale donnée, augmente avec le rayon de courbure de la paroi <sup>251</sup>. Cet étirement est ressenti aussi bien par les cellules musculaires lisses que par les cellules endothéliales. Au niveau systémique, l'étirement ne va pas au delà de 10-12% de la taille de la cellule. Différentes modifications physiologiques ou pathologiques vont pouvoir augmenter cet étirement jusqu'à 60% de manière transitoire ou prolongée.

### Étirement physiologique :

L'étirement physiologique va permettre un alignement des cellules musculaires lisses perpendiculairement par rapport au sens de l'étirement, sens propice pour l'efficacité maximale de contraction du vaisseau <sup>372</sup>. Au niveau des cellules musculaires lisses, l'étirement physiologique permet également de maintenir le profil contractile des cellules <sup>36</sup>, la production de collagène <sup>127</sup> et limite la prolifération en stoppant le cycle cellulaire <sup>179</sup>.

Au niveau endothélial, cet étirement a un effet anti-apoptotique <sup>240</sup>. La barrière endothéliale est également renforcée, l'étirement induit la déphosphorylation de l'occludine par l'intermédiaire de différentes kinases dont PKCδ, ceci augmente l'association des jonctions serrées <sup>92</sup>. De plus, il active sélectivement les petites GTPases Rac ce qui conduit à un déplacement de l'actine polymérisée vers la périphérie et à une augmentation de l'actine corticale <sup>37</sup>.

### Étirement pathologique :

Les conséquences d'un étirement pathologique sont multiples <sup>215</sup>. L'effet de l'étirement cyclique excessif a été bien étudié dans les cellules musculaires lisses (Figure 6), ces dernières vont percevoir l'étirement grâce à la protéine FAK (focale adhésion kinase) et aux intégrines qui vont activer différentes MAPK (« mitogen-associated protein kinases ») conduisant à une prolifération et à une augmentation de la synthèse de fibronectine et de la métalloprotéinase MMP9 notamment <sup>222,425,426</sup>. La production d'espèces réactives de l'oxygène, de TGF-β1 et de VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire) est également augmentée <sup>256</sup> conduisant à une prolifération des cellules musculaires lisses <sup>317</sup>. De plus, l'expression de protéines contractiles et du cytosquelette est aussi augmentée (par exemple : la « myosin light chain » kinase, la protéine « smooth muscle myosin heavy chains » et la desmine) <sup>38,366,367</sup> ainsi que l'expression du récepteur à la thrombine, PAR-1 <sup>283</sup>. Enfin, un étirement excessif augmente l'oxydation des LDL par les cellules musculaires lisses <sup>11</sup>.

Au niveau endothélial, les effets d'un étirement excessif sont plus divers (Figure 6). Premièrement, l'étirement cyclique peut modifier le contrôle des cellules endothéliales sur la prolifération des cellules musculaires lisses <sup>296</sup>. Il conduit à la production de différentes protéines, en particulier des métalloprotéases MMP-14 et

-2 suite à l'activation de JNK (« c-jun N-terminal kinase »), ainsi que de la plasmine et de l'élastase qui participent au détachement et à l'apoptose des cellules endothéliales <sup>268,412</sup>. En l'absence de contraintes de cisaillement lié au flux, l'étirement des cellules endothéliales conduit à une réorganisation des fibres de stress intracellulaires perpendiculairement au vaisseau ce qui provoque une perte de la dilation dépendante de l'endothélium <sup>365</sup> et une augmentation de la perméabilité <sup>37</sup>. Cette formation de fibres de stress est liée à l'activation des petites GTPases Rho et non plus de Rac <sup>314,437</sup>. Cet étirement régule également l'expression génique au sein des cellules conduisant par exemple à la modulation de protéines comme les ZIP kinases ayant pour conséquence une augmentation de la perméabilité endothéliale au niveau pulmonaire <sup>37</sup>, mais aussi à l'expression de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-8, le TGFβ, le VEGF, ou encore MCP-1 <sup>432,446</sup>.

L'induction de tous ces paramètres concourt à la dysfonction endothéliale observée dans différentes pathologies comme l'hypertension ou l'œdème pulmonaire.

#### Mécanismes d'action :

L'étirement va moduler ces différents paramètres par l'activation de voies spécifiques passant par de nombreuses kinases et facteurs de transcription. En particulier, l'étirement provoque la production de ROS aussi bien dans les cellules musculaires lisses <sup>190</sup> que dans les cellules endothéliales <sup>257</sup> (Figure 6). Cette production est médiée par plusieurs effecteurs : La NADPH oxydase <sup>257</sup>, les mitochondries <sup>11</sup> ou encore la xanthine oxydase <sup>2</sup>.

Au niveau de la cellule musculaire lisse, de nombreux effets délétères de l'étirement excessif peuvent être contrecarrés par un traitement antioxydant : l'activation de NFκB, la production de métalloprotéinases, l'oxydation des LDL. De plus la production de ROS par la NADPH induite par l'étirement conduit à l'activation de p38 MAP (« mitogen associated protein ») kinase et JNK (« c-jun N-terminal kinase ») perturbant l'alignement à 90° par rapport au sens d'étirement <sup>75</sup>.

Au niveau endothélial, alors qu'un étirement physiologique va induire la production de NO par activation de la voie PI3K/Akt/eNOS <sup>214</sup>, l'étirement pathologique induit l'activation de la xanthine oxydase par le biais de p38 et ERK1/2 MAP kinase, augmentant la production de ROS <sup>2</sup>. Enfin, les mitochondries

semblent également jouer un rôle de senseur de l'étirement par le biais du cytosquelette, libérant alors des ROS dans le cytosol <sup>11</sup> qui vont pouvoir activer la kinase d'adhésion focal (FAK) puis la protéine kinase C (PKC). L'activation de NADPH oxydase et la production de ROS vont également augmenter la production de VEGF et ainsi moduler la perméabilité endothéliale <sup>256</sup>.

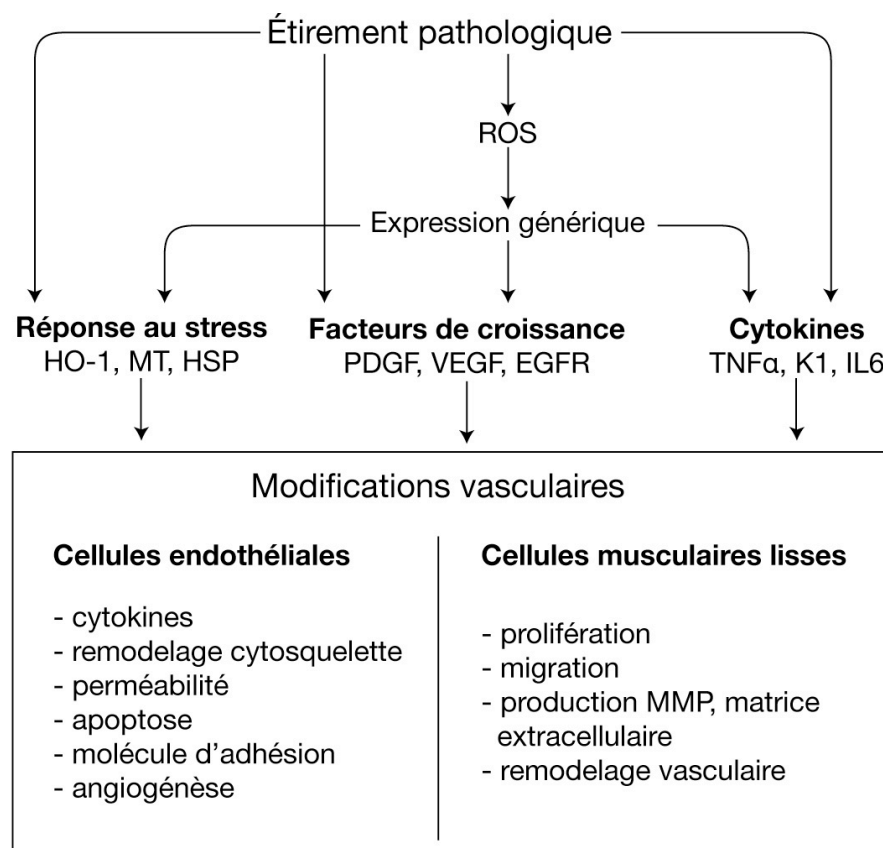


Figure 6 : Effets de l'étirement excessif au niveau vasculaire (adapté de Birukov 2009<sup>35</sup>)



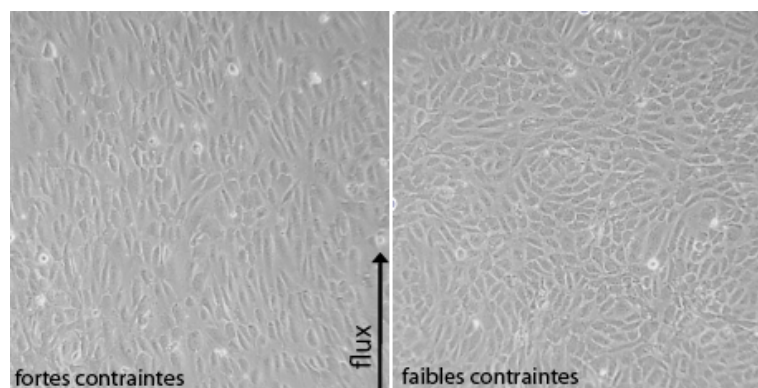
### A.3.2. Cellules endothéliales et contraintes de cisaillement

Contrairement à l'étirement, la contrainte de cisaillement exercé par le sang circulant est, elle, ressentie majoritairement par les cellules endothéliales. Ces dernières sont donc spécialisées dans la perception de cette force. Les cellules musculaires lisses comme les fibroblastes ne vont pas percevoir le flux dû au sang circulant mais percevoir un flux interstitiel transmural qui variera selon l'intégrité du vaisseau<sup>353</sup>. La contrainte de cisaillement correspond aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elle est déterminée par le débit (Q) et la viscosité ( $\mu$ ) du sang ainsi que par le rayon (r) du vaisseau selon la loi de Poiseuille (pour un flux laminaire) :

$$\tau = 4 \mu Q / \pi r^3$$

La valeur moyenne de cette contrainte, dans une portion droite de vaisseau est comprise entre 1 et 2 Pa, soit 10 et 20 dyn/cm<sup>2</sup> (chez l'homme)<sup>116</sup>. Il est à noter que pour un flux pulsatile la formule prendra en compte la fréquence des pulses. Une variation de diamètre du vaisseau entraînera de grands changements de contrainte de cisaillement. De même, la viscosité du liquide modulera directement cette force. Dans le sang, le facteur majeur modulant la viscosité est la concentration en globules rouges. En conséquence cette contrainte est le senseur idéal des modifications physiques et hématologiques du vaisseau.

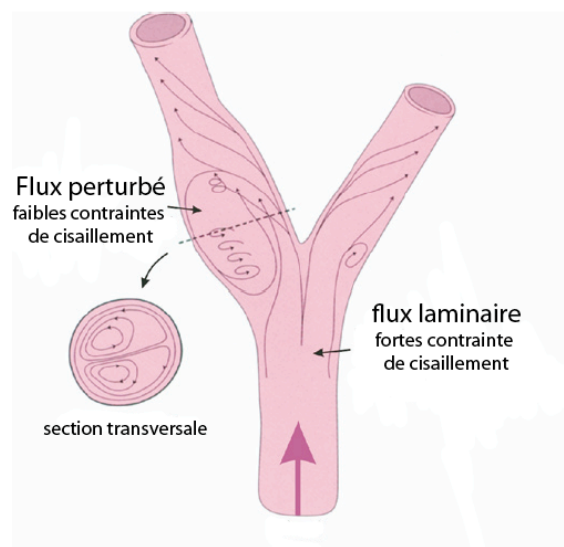
En condition physiologique de fortes contraintes de cisaillement, les cellules endothéliales adoptent une morphologie particulière, elles s'allongent et s'alignent dans la direction du flux. En condition de faibles contraintes de cisaillement (flux faible ou oscillant), elle perdent cette capacité d'alignement <sup>329</sup> (Figure 7).



**Figure 7 : Cellules endothéliales soumises à différentes contraintes de cisaillement (physiologiques ou non)**

Cellules endothéliales (« Human Umbilical Vein Endothelial Cells ») soumises à des contraintes de cisaillement de 20dyn/cm<sup>2</sup> (fortes contraintes) ou de 2dyn/cm<sup>2</sup> (faibles contraintes) pendant 24h. Images obtenues au laboratoire.

Au sein de l'arbre vasculaire, la valeur de cette contrainte va être dépendante de la structure du vaisseau. En effet, la présence d'irrégularités, d'obstructions ou de courbes va modifier le courant sanguin local. Ainsi, dans les zones linéaires de l'arbre vasculaire les contraintes de cisaillement vont être laminaires pulsatiles (dû aux battements cardiaques), le sang circulant en lignes parallèles sur l'endothélium ; ce type de contraintes s'observe dans les gros troncs artériels, les artères de résistance et les artérioles. Au contraire, dans les zones de bifurcations artérielles et de courbes, le flux devient plus faible (entre 0 et 10 dyn/cm<sup>2</sup>) ; au niveau des embranchements de collatérales, le flux devient également oscillatoire (bidirectionnel) ; les contraintes de cisaillement varient alors autour de 0 dyn/cm<sup>2</sup> <sup>154,244,375</sup> (Figure 8).



**Figure 8 : Modification des contraintes de cisaillement en fonction de la géographie de l'arbre vasculaire (d'après Chatzizisis 2007<sup>72</sup>)**

Cependant, il est important de noter qu'en plus du caractère oscillatoire, le caractère turbulent du flux est à prendre en compte. Celui-ci est défini par un autre paramètre : le nombre de Reynolds. Celui-ci dépend de la viscosité et de la vitesse du fluide. Pour des conditions géométriques données, plus un fluide va être rapide et peu visqueux plus la turbulence après un obstacle sera élevée ( $Re > 2000$ , Figure 9 C). Au contraire, un fluide plus visqueux et circulant moins vite conservera un flux laminaire après obstacle ( $Re < 2000$ , Figure 9A et B) <sup>72</sup>.

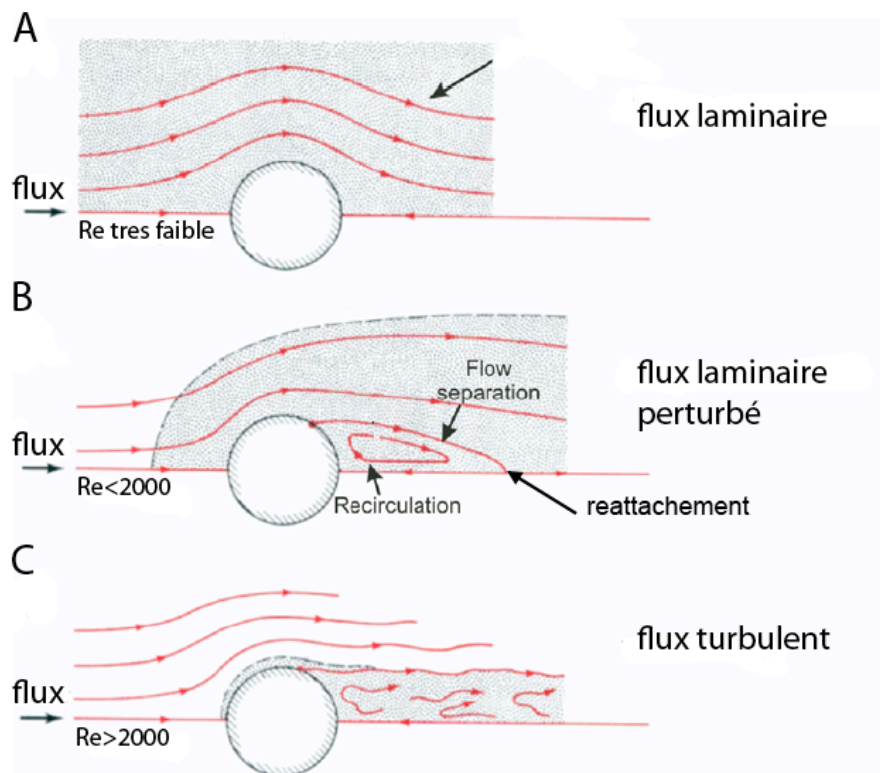


Figure 9 : Flux laminaire et turbulent : le nombre de Reynolds (d'après chatzizisis 2007<sup>72</sup>)

Pour percevoir ces forces et ces possibles changements, la cellule endothéliale dispose de nombreux capteurs comme les intégrines, les molécules de jonctions, les canaux ioniques ou encore le glycocalyx. Certains sont préférentiellement activés dans une réponse précoce (ex : canaux ioniques), tandis que d'autres seront plus impliqués dans des réponses tardives aux contraintes de cisaillement (ex : certaines intégrines). De même, le degré de contraintes (faible ou fort) va conduire à des activations différentes. Les fonctions et mécanismes d'action de ces capteurs sont détaillés ci-dessous (Figure 12).

### Les canaux ioniques

Les canaux ioniques ont été décrits comme étant les éléments réagissant le plus rapidement à l'application d'un flux.

Les canaux  $K^+$  sont activés très rapidement dès de très faibles contraintes de cisaillement ( $0.7 \text{ dyn/cm}^2$ ) pour atteindre un maximum d'activation à  $15 \text{ dyn/cm}^2$  <sup>299</sup> et vont provoquer une hyperpolarisation membranaire. Les canaux  $Cl^-$  participent aussi à la détection du flux mais leur action dépolarisante est retardée comparé à l'action des canaux  $K^+$  <sup>23,281</sup> leurs actions augmentent avec les contraintes de cisaillement pour

atteindre la saturation à  $3 \text{ dyn/cm}^2$  <sup>152</sup>. Il existe également un canal anionique régulateur de volume (VRAC) qui lui n'est actif que sous faibles contraintes de cisaillement <sup>331</sup>. Des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  ont également été décrits comme senseurs des contraintes de cisaillement <sup>200,281</sup>. Ces modifications du potentiel membranaire et des charges intracellulaires ont pour conséquence majeure une libération de calcium des réservoirs intracellulaires. Ce calcium induira, à son tour, l'activation de différents effecteurs comme le cytosquelette ou le NO. Il existe, de plus, des mécanismes d'autocontrôle : l'activité des canaux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  précocement activés par le flux va induire l'augmentation de l'expression des canaux cotransporteurs Na-K-Cl <sup>377</sup>.

### Les intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées systématiquement d'une unité  $\alpha$  et d'une unité  $\beta$ . La partie extracellulaire reconnaît spécifiquement les éléments de la matrice extracellulaire (MEC). Au niveau intracellulaire, les intégrines forment des complexes avec différentes kinases et protéines du cytosquelette (FAK, Shc, taline ou actinine par exemple) <sup>189,338</sup> appelés sites d'adhésion focale.

Ainsi l'activation d'un site d'adhésion focale par les contraintes de cisaillement va pouvoir déclencher des événements intracellulaires conduisant à des modifications du cytosquelette stabilisant la structure nucléaire <sup>249</sup>. Le recrutement des FAK et l'activation de ces sites conduiraient également à l'orientation des cellules endothéliales dans le sens du flux <sup>231</sup>. Une étude récente utilisant des billes magnétiques recouvertes spécifiquement pour reconnaître différents types d'intégrines montre qu'elles vont pouvoir activer des signalisations différentes. Ainsi les intégrines reconnaissant le collagène de type I vont avoir un effet rapide suite à l'exposition aux contraintes de cisaillement en activant ERK1/2 dans les premières minutes, les intégrines reconnaissant le domaine RGD vont avoir, elles, un effet à long terme en activant Akt et la production de NO après plusieurs heures d'exposition <sup>87</sup>. De manière intéressante, les contraintes de cisaillement peuvent activer la protéine tyrosine kinase  $\beta$  de manière dépendante du calcium, celle-ci participera alors à l'activation des sites d'adhésion focale <sup>382</sup>, montrant ainsi qu'il existe une *interconnexion* entre les différents types de senseurs mécaniques.

### VEGFR2, PECAM-1 et VE-Cadhérine

Les fortes contraintes de cisaillement peuvent induire la phosphorylation du récepteur 2 au VEGF (« vascular endothelial growth factor », Flk-1), son oligomérisation et son association avec la protéine Shc permettant son activation sans la présence de VEGF. Cette activation est rapide et probablement médiée par les intégrines <sup>417</sup>, elle disparaît après 30min d'exposition continue aux contraintes de cisaillement <sup>74</sup>. Les effecteurs avals de cette activation sont ERK1/2 et JNK <sup>197</sup> mais aussi Akt et la NOS endothéliale (Figure 10).

PECAM-1 (« platelet endothelial cell adhesion molecule ») est une protéine membranaire jouant un rôle dans l'interaction entre cellules endothéliales et leucocytes. Dans une couche confluente de cellules endothéliales elle est présente principalement aux jonctions cellulaires et elle a notamment un rôle anti-apoptotique <sup>34</sup>. De fortes contraintes de cisaillement (>5dyn/cm<sup>2</sup>) induisent la phosphorylation passagère de PECAM-1 là aussi très rapidement (1min) <sup>300</sup>. Cette phosphorylation est suivie du transfert de SHP-2 au niveau des jonctions, PECAM-1 et SHP2 formant alors un complexe conduisant là encore à l'activation de ERK1/2 <sup>301</sup> (Figure 10). De plus, PECAM-1, VEGFR2 et la VE-cadhérine peuvent s'associer pour former un complexe mécanosensible induisant la translocation de NFkB <sup>393</sup>.

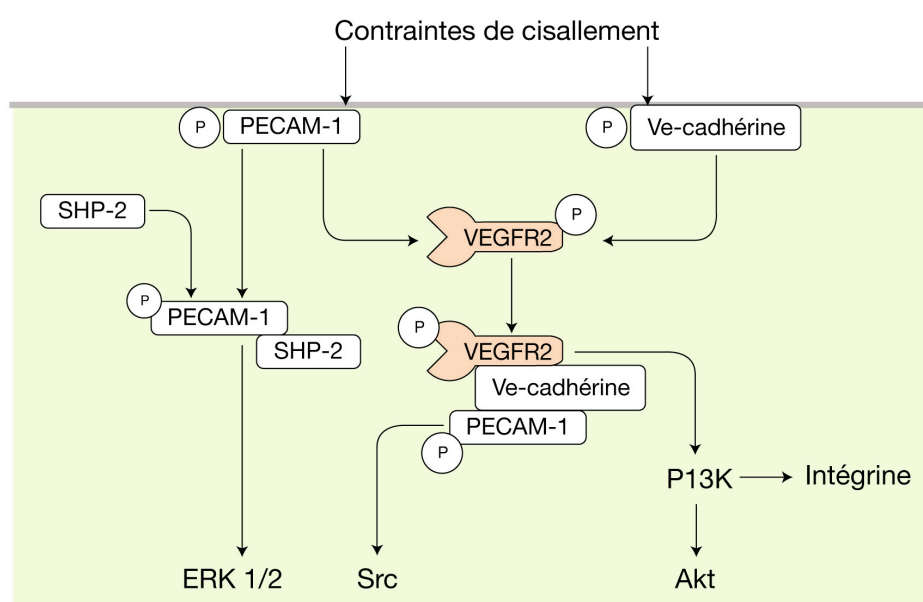


Figure 10 : Mécanismes d'action de PECAM-1 et du complexe PECAM-1/Ve-Cadherine/VEGFR2

### Le glycocalyx

Le glycocalyx des cellules endothéliales (Figure 11) a également un rôle de mécanosenseur <sup>22</sup>. La destruction de différentes glycoprotéines comme les heparansulfates ou les hyaluronansulfates empêche la production de NO induite par les fortes contraintes de cisaillement (alors que la cellule est toujours capable de produire le NO par d'autres stimuli) <sup>139,302</sup>. De plus, le glycocalyx joue un rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine : là encore un traitement détruisant les glycoprotéines induit une perte de l'alignement en réponse aux fortes contraintes de cisaillement <sup>385</sup> suite à un défaut de réorganisation de l'actine. Il semble aussi exister une boucle rétrocontrôle entre épaisseur du glycocalyx et contraintes de cisaillement, ces dernières induisant la production *de novo* de ses constituants <sup>161</sup>. Il est important de noter que la composition du glycocalyx *in vitro* est différentes de celle observée *in vivo* dans la microcirculation <sup>313</sup>, les effets associés à un type de glycosaminoglycans doivent donc être considérés en fonction du type de vaisseaux observés.

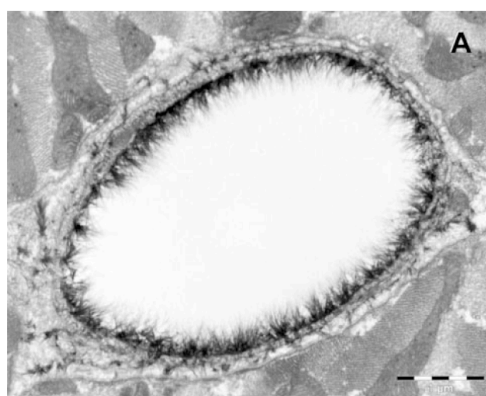


Figure 11 : microscopie électronique d'un capillaire après marquage du glycocalyx (extrait de Van den Berg 2003<sup>397</sup>)

### Cavéoles et lipides membranaires

La contribution de la cavéoline-1 aux mécanismes de sensation des contraintes de cisaillement a été mise en évidence grâce aux souris déficientes en cavéoline-1. Les vaisseaux de ces souris présentent un défaut de vasorelaxation en réponse à de fortes contraintes de cisaillement, ceci étant dû au défaut d'activation de la eNOS <sup>439</sup>. Les auteurs montrent également que la cavéoline participe aux effets à court et long terme des fortes contraintes de cisaillement.

Deux équipes ont, de plus, pu montrer par deux méthodes différentes que l'application de fortes contraintes de cisaillement augmente localement la fluidité de la

membrane lipidique (maximum de fluidité à 7 min) <sup>169</sup> ce qui conduit à l'activation de ERK1/2 et JNK <sup>56</sup>. Une étude plus récente montre également qu'en fonction de leur organisation les microdomaines membranaires (tels que les radeaux lipidiques ou les cavéoles) vont percevoir de manière différente (en temps et intensité) les contraintes de cisaillement. Cela aura pour conséquence une réorganisation des zones non organisées (zones autres que microdomaines) diminuant la viscosité de la membrane <sup>381</sup>. Les auteurs suggèrent un rôle du glycocalyx dans la transmission du signal mécanique aux lipides.

### Protéines G et leurs récepteurs

L'activation des protéines G par les fortes contraintes de cisaillement se fait dans les premières secondes d'exposition. Cette activation peut être dépendante ou indépendante de l'activation des récepteurs aux protéines G et est indépendante du cytosquelette <sup>165</sup>. Cependant, les changements de fluidité membranaire seraient responsables du changement de conformation des récepteurs nécessaires à leur activation <sup>65</sup>. L'activation de ces protéines va conduire à l'activation de ERK1/2 comme bien d'autres senseurs mais aussi des Ras-GTPase

164

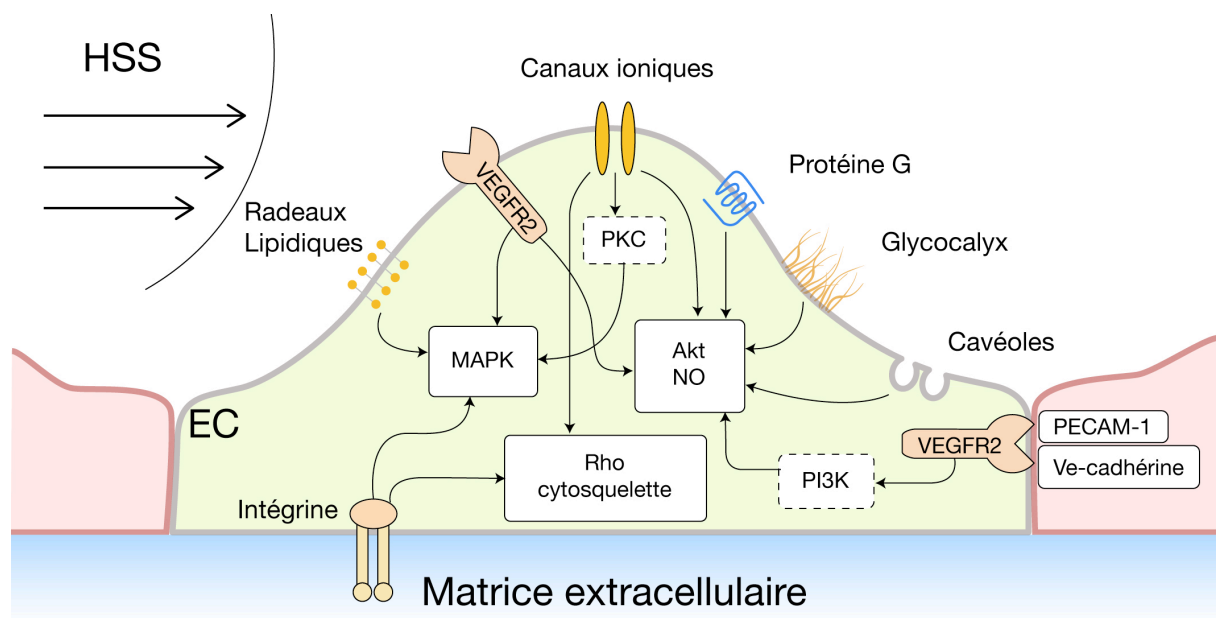


Figure 12 : Schéma récapitulatif des différents mécanosenseurs

### A.3.3. La mécanotransduction des contraintes de cisaillement

D'un point de vue biologique, la mécanotransduction est la transformation d'un message mécanique en message chimique. Les mécanosenseurs présentés ci-dessus font partie intégrante de ce phénomène qui va conduire à l'activation de cascades de signalisation et à la modulation de l'expression génique. A terme, différentes fonctions des cellules endothéliales seront modulées. Comme nous avons pu le voir ces mécanosenseurs peuvent interagir ensemble, s'activer les uns les autres, agir sur des voies communes ou différentes, à long terme ou à court terme.

Les fortes contraintes de cisaillement vont induire l'activation de toute une variété de protéines en particulier de kinases comme les protéines kinases C (PKC) les kinases d'adhésion focale (FAK), les petites protéines Rho à activité GTPase (Rho GTPase), les phosphoinositide 3 kinases (PI3K) et enfin les « mitogene-associated protein kinases » (MAPK).

Les protéines kinases C ont de nombreux substrats. Sous fortes contraintes de cisaillement l'ensemble des PKC va être induit sur une durée de 30 min <sup>285</sup> cela conduira à l'expression de l'endothéline 1 (ET1) et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PGDF) <sup>181,213,275</sup>. Les contraintes de cisaillement activent en particulier certaines isoformes de PKC : PKC $\beta$  va être activée dans les régions corticales principalement <sup>183</sup>, PKC $\epsilon$  va quant à elle induire l'activation de ERK et MCP-1 <sup>285,390</sup>. PKB participe également à l'activation de Akt par les fortes contraintes de cisaillement <sup>156</sup>.

L'activation des PI3K par les fortes contraintes de cisaillement est transitoire <sup>157</sup> mais permet une activation plus longue de Akt (6h) qui va phosphoryler la NOS endothéliale, permettant ainsi la production de NO et ce durant une longue période <sup>44,45,55,120,136</sup>. En plus d'une régulation par PI3K, Akt peut être activée par la glutaredoxine engendrant là aussi une production de NO<sup>413</sup>. Les fortes contraintes de cisaillement augmentent aussi l'expression du microARN-21, qui va réduire l'expression de PTEN, augmenter la phosphorylation de la NOS et la production de NO<sup>421</sup> (Figure 13).

Les petites protéines Rho à activité GTPase (Rho GTPase) appartiennent à la famille des protéines Ras et sont composées de 3 sous-groupes : les protéines Rho



participant à la contraction cellulaire et à la formation de fibres de stress, les Rac impliquées dans la formation des lamellopodes et le Cdc42 régulant la formation des filopodes. Ces trois protéines ont été démontrées comme impliquées dans la réponse des cellules endothéliales aux fortes contraintes de cisaillement <sup>391</sup>. Cdc42 est activé rapidement (15min), tandis que l'activation de RhoA est plus lente (2h) ; ces deux voies conduisent à l'activation de JNK, mais seul RhoA participe à l'alignement des cellules dans le sens du flux <sup>232</sup>. Enfin, l'activation de Rac, localisée dans la partie distale de la cellule par rapport au sens du flux, induit aussi l'activation de JNK <sup>232</sup> et de facteurs de transcription comme NFκB et c-fos <sup>358,392</sup>. Sous fortes contraintes de cisaillement, les cellules ne sont pas uniquement alignées dans le sens du flux mais sont également polarisées avec une localisation du centre des microtubules en amont du noyau. Cette localisation est régulée par de nombreuses protéines du cytosquelette péri-nucléaires dont nesprin-3, activée par les contraintes de cisaillement <sup>274</sup>.

Un autre effecteur de la signalisation mécanique est FAK <sup>443</sup>. Cette protéine est activée/phosphorylée par les intégrines <sup>359</sup>. FAK va alors s'associer à Src et PI3K via leurs domaines SH2 <sup>59</sup>. Cette association avec Src phosphoryle FAK qui va alors s'associer avec Grb2/SOS, activant alors Ras et les MAPKs <sup>73,344</sup>, notamment ERK2 et JNK1 <sup>233</sup>. Il est à noter que bien que l'activation de FAK soit soutenue sous fortes contraintes de cisaillement <sup>191</sup>, l'association avec Src est elle éphémère (10min).

La plupart des effecteurs cités modulent les MAPK, kinases centrales dans la mécanotransduction. Elles régulent la prolifération, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire, l'apoptose et l'expression génique ainsi que bien d'autres fonctions <sup>305</sup>. Elles sont séparées en trois groupes : les « extracellular signal regulated kinases » (ERK1/2/5), les « c-jun N-terminal kinases » (JNK1/2/3) et les « p38 kinases α/β/δ/γ. » Ces kinases sont phosphorylées par une cascade de kinases impliquant les MEK et MEKK. Les fortes contraintes de cisaillement activent rapidement (dès 5min) mais de manière transitoire ERK1/2 ; les JNK sont activées légèrement plus tardivement que ERK1/2 (30min). Ces deux phosphorylations dépendent de l'activation de la cascade Ras-Raf-MEK <sup>193,234</sup>. Les protéines p38 présentent un pic d'activité à 30min. Les protéines G contribuent à l'activation des ces MAPK, Gβ/γ activant JNK tandis que Gα<sub>12</sub> active ERK1/2 <sup>157,164,199</sup>. L'activation de ERK5 est, quant-à-elle, plutôt médiée par l'augmentation du calcium intracellulaire et la production de NO <sup>434</sup>.

Les MAPK vont avoir également comme rôle d'activer différents facteurs de transcription comme c-myc, AP1, ou encore NFκB. A l'état inactif, NFκB est associé à IκB, la phosphorylation de IκB par IKK va permettre sa dégradation et la libération de NFκB qui va alors migrer vers le noyau. Les fortes contraintes de cisaillement vont pouvoir activer transitoirement NFκB par les MAPK mais également par la voie VEGFR2-Akt 32,416.

Enfin, les facteurs de transcription KLF (« Kruppel-like factor ») 2 et 4 jouent un rôle important dans les processus anti-inflammatoires activés par les fortes contraintes de cisaillement <sup>170</sup> et dans la production de NO <sup>110,351</sup>. L'activation de KLF2 par les fortes contraintes de cisaillement permet de maintenir le caractère quiescent des cellules endothéliales, notamment en augmentant l'expression de l'ARNm et de la protéine de la NOS <sup>109</sup>. Les MAPK, par l'intermédiaire de MEK5 et ERK5, modulent l'activité de KLF4 et KLF2 <sup>90</sup>. L'expression de KLF2 serait, elle, régulée par l'activation d'AMPK. Une étude récente montre que la régulation de KLF2 par les contraintes de cisaillement serait aussi médiée par le microRNA-92a <sup>431</sup> et par les cils présents à la surface de l'endothélium <sup>177</sup> (Figure 13).

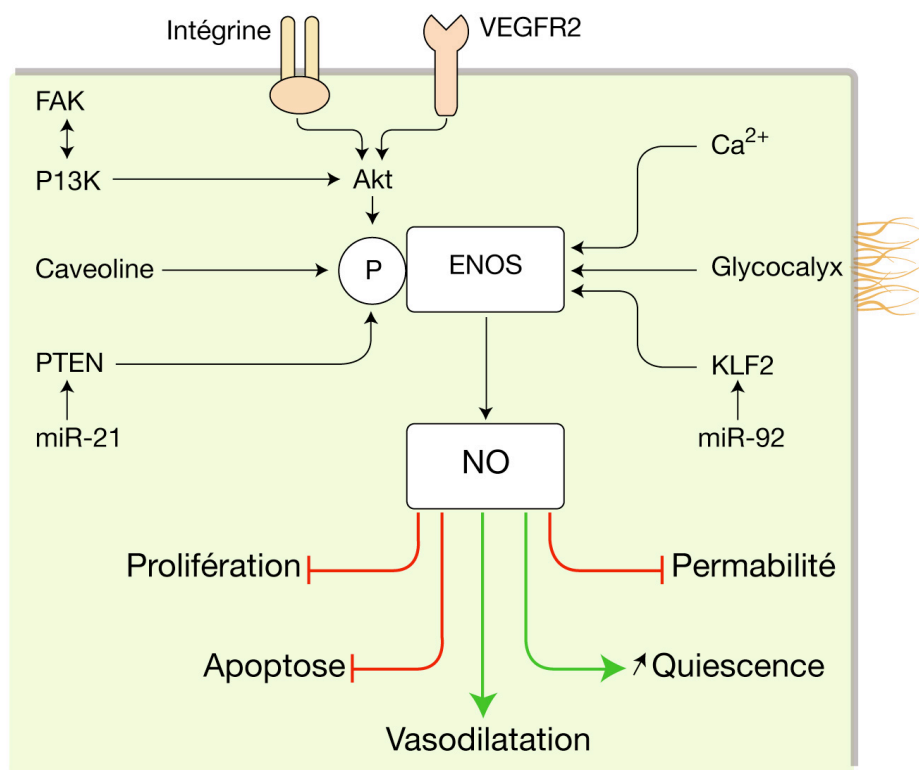


Figure 13 : Mécanismes de production de NO sous fortes contraintes de cisaillement et effets du NO

### **A.3.4. Contraintes de cisaillement physiologiques et fonctions endothéliales**

#### Alignement

L'impact des fortes contraintes de cisaillement sur l'alignement des cellules endothéliales est un effet majeur. En effet, cela permet à la cellule d'être dans une conformation hydrodynamique favorable. Cet effet a été observé très tôt dans les études traitant de l'endothélium <sup>116</sup>, cependant les mécanismes qui y conduisent ont été identifiés plus tardivement. L'alignement des cellules se déroule en 3 phases <sup>148</sup>. Premièrement (0-3h), la cellule s'allonge grâce à la formation de fibres de stress et de microfilaments, les jonctions intercellulaires se cassent. Deuxièmement (3-6h), la cellule bouge grâce aux microtubules et le noyau se retrouve localisé dans la zone amont de la cellule. Enfin (6-12h) la cellule termine l'alignement en alignant les fibres de stress intracellulaires entre elles et en restaurant les jonctions inter-cellulaires. Ces mécanismes sont sous la dépendance du calcium intracellulaire, de l'actine et des microtubules, de JNK2, des intégrines  $\alpha 4$  ainsi que RhoA et Rac1 ; en revanche, ils sont indépendants de PKC, des canaux ioniques, de Cdc42 ou PI3K <sup>159,168,232,245,428</sup>. Enfin, il semble que la composition de la matrice extracellulaire participe à cette régulation, car des cellules en culture sur un collagène glycosylé perdent leur alignement dans le sens du flux<sup>208</sup>.

#### Apoptose

Les contraintes de cisaillement physiologiques ont été décrites comme suppresseur d'apoptose. En effet, le  $\text{TNF}\alpha$ , les ROS (« reactive oxygen species ») ou les oxLDL ne sont plus capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales lorsque celles-ci sont soumises à des contraintes de cisaillement physiologiques <sup>121,175</sup>. Cette survie serait médiée par l'inhibition de  $\text{IL1}\beta$ , de DAPK (« death associated protein kinase ») <sup>121</sup> et de caspase-3 <sup>123,143</sup>. La pré-exposition aux contraintes de cisaillement bloquerait également l'activation de JNK par le  $\text{TNF}\alpha$ , contrecarrant ses effets pro-inflammatoires <sup>376</sup>. La production de NO sous fortes contraintes de cisaillement est l'élément majeur médiant tous ces effets protecteurs contre l'apoptose <sup>120,121,123</sup>. Les contraintes de cisaillement physiologiques induisent également l'expression de protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP-1 et -2) <sup>196</sup>. L'activation de VEGFR2 par les

fortes contraintes de cisaillement contribue également à la protection contre l'apoptose<sup>112</sup>.

### Prolifération

La prolifération est un autre des mécanismes stoppés par les fortes contraintes de cisaillement. Dans ces conditions, la production d'ADN est ralentie, les cellules s'arrêtent en phase G0-G1 du cycle cellulaire<sup>8</sup> principalement grâce à la régulation de p53 (suppresseur de tumeur), qui va à son tour activer p21<sup>cip1</sup> bloquant alors la progression du cycle grâce à la phosphorylation de la protéine rétinoblastoma<sup>236</sup>. De plus, certains microRNA contribuent à ce processus : le microRNA 19a augmenté par les fortes contraintes de cisaillement réprime l'expression de cyclinD1 arrêtant le cycle cellulaire en G1<sup>316</sup>. Les fortes contraintes de cisaillement activent à la fois AMPK et Akt, cela permet une régulation fine du cycle entre l'effet antimitotique d'AMPK et prolifératif d'Akt<sup>166</sup>. L'effet des contraintes de cisaillement apparaît comme dose-dépendant : plus les contraintes sont fortes, moins les cellules prolifèrent<sup>228</sup>. Il est à noter que le NO endogène ne semble pas participer à la régulation de la prolifération endothéliale alors que le NO exogène a un effet anti-prolifératif à forte dose<sup>160</sup>.

### Migration

L'impact des contraintes de cisaillement sur la migration endothéliale est moins bien connu que les précédents effets. En effet, les études permettant d'élucider les mécanismes de migration cellulaire ont pour la plupart été réalisées sous condition statique. Dans un tapis confluent de cellules, de fortes contraintes de cisaillement induisent une mobilité<sup>384</sup>. Au niveau de blessures de l'endothélium, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la recolonisation par les cellules endothéliales voisines était plus rapide sous fortes contraintes de cisaillement<sup>158,182,370</sup>, la fluidité membranaire jouant un rôle important dans la migration. Les fortes contraintes de cisaillement étant connues pour activer les lamelopodes<sup>106,231</sup> et les FAK par le biais des RhoGTPases et des intégrines, cela pourrait expliquer leur action sur la migration cellulaire.

### Perméabilité

Alors que l'endothélium soumis à de fortes contraintes de cisaillement est très imperméable aux macromolécules, les zones de faibles contraintes de cisaillement ont

très tôt été décrites comme ayant une perméabilité accrue aux LDL <sup>29,374</sup>. Il semble y avoir une forte corrélation entre prolifération et perméabilité, puisque différentes études ont montré que les zones de perméabilité corrélaient avec les zones de mitose <sup>76</sup> et avec le renouvellement cellulaire <sup>88</sup>. Cette perméabilité dépend des forces appliquées et est également réversible <sup>198</sup>. Des études *in vitro*, ont de plus permis de mettre en évidence que les remaniements pour que les cellules s'alignent dans le sens du flux conduisent à une augmentation de la perméabilité, celle-ci diminue une fois l'alignement obtenu <sup>349</sup>. Au niveau intracellulaire, l'effet « court terme » est médié par une baisse de l'expression et une augmentation de la phosphorylation de l'occludine <sup>113</sup>. Chang *et al.* ont démontré que cet effet « court terme » sous fortes contraintes de cisaillement pouvait être NO-dépendant, et que l'AMP cyclique contrecarrerait cette augmentation <sup>69</sup>. Au contraire, la baisse de la perméabilité à « long terme » passerait quant à elle par l'activation de la voie PI3K-NO-cGMP <sup>418</sup>. Le NO jouerait donc un double rôle, augmentant la perméabilité à court terme en jouant sur l'AMP cyclique (rôle non défini) et diminuant la perméabilité à long terme par mobilisation du cGMP.

Pour résumer, cette réponse physiologique aux fortes contraintes de cisaillement se fait donc en deux temps *in vitro*, une activation précoce médiée principalement par les MAPK et le cytosquelette, permettant un réalignement rapide. Une fois les cellules alignées, les activités des MAPK diminuent tandis que l'activation de la voie Akt-NO reste active tout comme le cytosquelette (même si les effecteurs changent), permettant ainsi une réponse physiologique correspondant à ce qui est observé *in vivo*. Les cellules endothéliales ont alors leur rôle de barrière, de médiateur de la vasomotricité et de modulateur de l'hémostase. Cependant, comme présenté en début de ce paragraphe, il existe des zones de l'arbre vasculaire naturellement soumises à de plus faibles contraintes de cisaillement de part la forme même des vaisseaux qui peut modifier les écoulements locaux. La mécanotransduction est alors activée de manière différente, activant l'endothélium, ceci favorisant l'apparition de différentes pathologies dont l'athérosclérose.

## ***A.4. L'endothélium : Réponses pathologiques, cas de l'athérosclérose***

### **A.4.1. L'athérosclérose : définition**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères. C'est une maladie silencieuse à évolution lente dont l'expression se traduit cliniquement par la survenue d'accidents ischémiques aigus (angor instable, mort subite, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, ischémie des membres inférieurs). Ces événements sont consécutifs à une rupture ou une érosion de la plaque d'athérosclérose avec formation d'un thrombus obstruant la lumière vasculaire. Elle est nommée en 1904 par Marchand qui invente le terme d'athérosclérose dont la dénomination résulte de la contraction d'« athérome » : bouillie et de « sclérose » : dure et cassant en grec. Cette étymologie reflète bien les composantes lésionnelles (inflammatoires), athéromateuse (lipidique) et scléreuse (fibreuse) de la maladie.

Cette maladie n'est certainement pas une maladie récente puisque des plaques d'athéromes ont été identifiées sur des corps momifiés égyptiens <sup>50</sup>. Elle représente aujourd'hui la première cause de mortalité mondiale. D'après l'OMS, On estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,3 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,2 millions à un accident vasculaire cérébrale (statistiques 2008). De part les changements de style de vie et le vieillissement global de la population, l'athérosclérose, ou plutôt ses conséquences pathologiques sont en pleine expansion : d'ici 2030, 23 millions de personnes mourront d'une maladie cardio-vasculaire. Cela en fait donc un des enjeux majeurs de la recherche et de la médecine actuelle.

### **A.4.2. Les facteurs de risque**

Différents éléments participent à l'apparition et à la progression de la plaque d'athérosclérose. Ces facteurs ont des origines très diverses.

Les habitudes de vie jouent un rôle important dans la progression de la maladie :

- Le tabagisme : La nicotine favorise la vasoconstriction des artères (stimulation des récepteurs adrénergiques  $\alpha_1$ ). Les toxines présentes dans la fumée de la cigarette augmentent l'inflammation des cellules vasculaires, le stress oxydant et la thrombogénicité <sup>41,220,335</sup>.

- La sédentarité : Le manque d'activité physique diminue la résistance des artères. Ainsi, des souris ApoE<sup>-/-</sup> soumises à une activité physique sont moins susceptibles de développer de l'athérosclérose <sup>297,355</sup>.

- Le régime alimentaire : Un régime riche en graisses et en sucres va favoriser le développement de pathologies associées à l'athérosclérose comme l'obésité ou le diabète (voir plus loin).

- L'athérosclérose peut aussi avoir une composante génétique bien qu'aucune mutation ou gène précis n'ait été identifié, les influences étant multiples. Le sexe influence la prédisposition, les hommes sont plus exposés bien que cette différence s'atténue après la ménopause. L'hypercholestérolémie familiale est la maladie génétique la plus fréquente dans les cas d'athérosclérose. Une étude a également mis en évidence que des variations géniques dans le gène de la eNOS (et donc probablement des variations dans la biodisponibilité du NO) sont un facteur de risque dans l'athérosclérose <sup>60</sup>.

Enfin certaines pathologies contribuent grandement au développement de la maladie :

- L'hypertension artérielle : Elle est due à une augmentation de la résistance périphérique totale et conduit à un remodelage vasculaire entraînant une rigidité. De manière intéressante, tout comme l'hypertension aggrave l'athérosclérose, l'athérosclérose complique et aggrave l'hypertension.

- Le diabète : Les données épidémiologiques établissent de façon certaine la corrélation entre les diabètes de type 1 ou 2 et la survenue de maladies coronaires <sup>315</sup>. L'excès d'insuline semble favoriser la prolifération des cellules musculaires lisses et participe à l'augmentation de la synthèse de protéines matricielles dans la paroi vasculaire. L'hyperglycémie peut induire la formation de produits de glycation avancée et une modification du stress oxydatif. Ces composants sont susceptibles d'engendrer un état inflammatoire propice à l'initiation de l'athérosclérose <sup>319</sup>.

- L'hypercholestérolémie : encore une fois, des études épidémiologiques montrent que des taux élevés de LDL-cholestérol sont des facteurs de risques, de même

pour les triglycérides <sup>419</sup>. Les LDL circulants peuvent infiltrer le sous-endothélium et s'y accumuler. Les lipoprotéines ainsi piégées dans l'intima subissent des modifications oxydatives et deviennent des LDL oxydées. Outre leurs effets sur la formation des cellules spumeuses, les LDL oxydées agissent également sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires <sup>49</sup>.

- L'obésité et le syndrome métabolique : si l'excès de poids ne semble pas jouer un rôle direct sur l'apparition de l'athérosclérose, il est très souvent associé au diabète, à l'augmentation du cholestérol et à l'hypertension artérielle. L'association d'au moins trois de ces facteurs conduit au syndrome métabolique.

#### **A.4.3. L'activation endothéliale**

Les zones subissant de faibles contraintes de cisaillement vont être le siège d'une activation endothéliale. Cette activation, pro-inflammatoire, proliférative et pro-apoptotique va perturber la physiologie des cellules conduisant à une dysfonction endothéliale <sup>82</sup>. C'est le point de départ de l'athérosclérose.

Sous faibles contraintes de cisaillement, la mécanotransduction ne se fait plus correctement. Notamment, la diminution de l'épaisseur du glycocalyx contribue à une perte de la sensibilité aux contraintes de cisaillement <sup>163,204</sup>.

##### Perte de la production de NO, augmentation des ROS

Premièrement, les faibles contraintes de cisaillement conduisent à une diminution de la synthèse de NO. L'expression de l'ARN messager de la eNOS est réduite, contrairement à celle de la cavéoline-1 qui est augmentée favorisant ainsi l'association eNOS-cavéoline1 et l'inactivité de la eNOS <sup>252</sup> (Figure 14). De même, une baisse de l'activité de Akt ou de l'expression du microARN-21 conduit à une diminution de la phosphorylation de la eNOS. Le postulat actuel propose que les faibles contraintes de cisaillement réduisent la production de NO et donc son rôle rétroactif inhibant NFκB. Cela a pour conséquence la synthèse d'éléments pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et pro-oxydants <sup>83,107</sup>. La production de ROS dans ces conditions est fortement augmentée et ce par plusieurs mécanismes. En plus d'une baisse d'expression, la eNOS peut également être découplée ou se trouver en manque d'un de ses substrats, elle



produit alors des anions superoxydes <sup>405</sup>. Ce découplage pourrait entre autre être dû à une moins forte stimulation des intégrines qui participent au couplage de la eNOS <sup>176</sup>. De plus, les faibles contraintes de cisaillement induisent une augmentation de l'activité NADPH oxydase par dérégulation de l'activité AMPK/Ras, conduisant là aussi à la production de ROS <sup>108,415</sup> ; enfin, les activités xanthine oxydase et COX sont aussi modulées <sup>263</sup> (Figure 14). La balance oxydant/anti-oxydant est également déstabilisée par la baisse du taux de glutathion intracellulaire, un agent réducteur <sup>171</sup>. La perte de NO ainsi que de la production de ROS rendent les cellules susceptibles à l'apoptose. En effet, alors que le NO prévenait l'activation des voies apoptotiques induites par des molécules telles que le TNF $\alpha$ , les conditions de faibles contraintes de cisaillement vont favoriser leur activation ou tout du moins permettre l'action des molécules pro-apoptotiques. Les faibles contraintes de cisaillement induisent également l'expression et l'épissage de XBP1, protéine de réponse au stress du réticulum endoplasmique, or une surexpression de cette protéine conduit à l'apoptose des cellules endothéliales par activation des caspases <sup>444</sup>.

### Prolifération et migration

Les faibles contraintes de cisaillement augmentent également la prolifération et le renouvellement des cellules endothéliales <sup>105,228</sup>. Cette prolifération accrue est liée à une activation soutenue de ERK au cours du temps <sup>85</sup>. De plus, l'inhibition de p21<sup>cip1</sup> permet le passage de la phase G0 vers G1-S <sup>8</sup>. Dans ces conditions l'activation d'Akt n'est plus accompagnée de celle d'AMPK ce qui permet une entrée des cellules en mitose <sup>166</sup>. Enfin, les cellules exposées à de faibles contraintes de cisaillement présentent des télomères plus courts et une accélération de la sénescence <sup>68</sup>. Les sollicitations moins importantes des intégrines induisent également une moins bonne migration des cellules endothéliales vers les zones lésées <sup>182</sup>.

### Organisation du cytosquelette

Les modifications du cytosquelette sont également touchées par les faibles contraintes de cisaillement. En effet, la réaction d'alignement des cellules ne se fait pas correctement, les fibres de stress courtes sont augmentées et perdent leurs alignements les unes par rapport aux autres, la structure des cellules est alors plus pavimenteuse et non alignée dans le sens du flux (Figure 7) <sup>409</sup>.

### Perméabilité

Les perturbations du cytosquelette ainsi qu'un renouvellement plus rapide des cellules contribuent à augmenter la perméabilité vasculaire. En effet, une relation inverse entre infiltration de LDL et renouvellement endothélial a été établi chez le rat <sup>88,237</sup>. Normalement les jonctions cellulaires sont fortes et ne permettent pas le passage des macromolécules. Cependant, les remodelages du cytosquelette et la division cellulaire fragilisent les jonctions intercellulaires <sup>422</sup>, les macromolécules peuvent alors franchir la barrière endothéliale. Différentes études ont de plus montré *in vivo* que les zones de faibles contraintes de cisaillement comme les embranchements étaient plus perméables que les zones linéaires de l'arbre vasculaire <sup>29,347,374</sup>. La connexine 43 (Cx43) et la VE-cadhérine ont été identifiées comme participant à cet effet, la connexine 43 est surexprimée par les faibles contraintes de cisaillement mais sa distribution à la membrane est perturbée <sup>147</sup>, la VE-Cadhérine est elle aussi délocalisée des jonctions cellulaires notamment du fait de la rupture de l'association avec la  $\beta$ -caténine <sup>267</sup>.

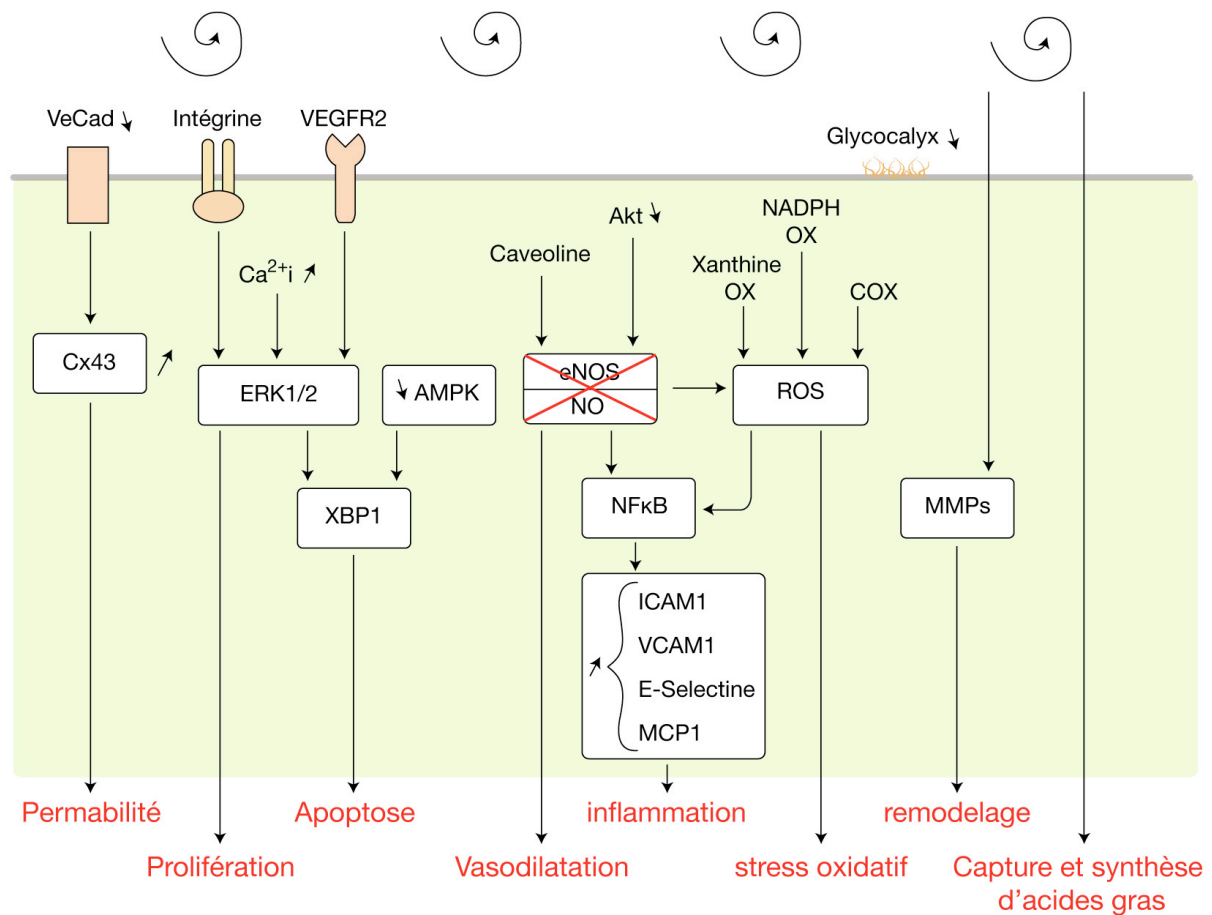
### Synthèse de lipides et capture des LDL

Les faibles contraintes de cisaillement sont également connues pour activer SREBP (« sterol regulatory element binding protein »), un facteur de transcription permettant l'expression de protéines responsables de la capture et la synthèse d'acides gras. Ainsi dans ces conditions le récepteur au LDL, la synthétase de cholestérol et la synthétase d'acide gras sont sur exprimées <sup>241</sup>.

### Inflammation

Le dernier point majeur régulé à la hausse par les faibles contraintes de cisaillement est le statut pro-inflammatoire. Ce point, avec la perméabilité est un des éléments les plus importants dans le développement de l'athérosclérose car il va permettre l'enchaînement de tous les processus conduisant à la progression de la plaque. Les faibles contraintes de cisaillement vont induire la transcription génique de nombreux éléments pro-inflammatoires, l'élément majeur médiant cette réponse inflammatoire est le NF $\kappa$ B <sup>280,304</sup>. Dans ces conditions, l'effet protecteur dû à l'activation de SSRE (élément de réponse au cisaillement), et des éléments de réponse PPAR $\gamma$  sous fortes contraintes de cisaillement <sup>242,280</sup> est perdu, tout comme l'inhibition de STAT3 <sup>284</sup>

engendrant la production de cytokines pro-inflammatoires. Les faibles contraintes de cisaillement influencent également l'expression ou l'activation de molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1, MCP1 et la Sélectine endothéliale <sup>70,84,411</sup>, permettant le recrutement leucocytaire. L'influence des faibles contraintes de cisaillement peut être vu sous deux angles, le premier où le recrutement est accru grâce à l'expression de molécules d'adhésion, le second où les forces hémodynamiques locales participent à un contact plus long entre les cellules circulantes et les cellules endothéliales (vélocité perpendiculaire augmentée et vitesse tangentielle diminuée) favorisant l'adhésion <sup>80</sup>.



**Figure 14 : Mécanismes intracellulaire activés par les faibles contraintes de cisaillement et leurs effets**

Pour note, les faibles contraintes de cisaillement ont également un effet sur la morphologie et la prolifération des cellules musculaires lisses. Alors que sous fortes contraintes de cisaillement les cellules musculaires lisses s'orientent perpendiculairement au flux (pour une meilleure contraction du vaisseau), cette orientation est perdue sous faibles contraintes de cisaillement <sup>81</sup>, de même la prolifération et la densité cellulaire sont accentuées.

#### A.4.4. Les étapes majeures de l'athérosclérose

Suite à l'activation endothéliale, les lipides vont s'accumuler dans la matrice sous-endothéliale et les premiers monocytes vont entrer dans cet espace pour se transformer en macrophages, éliminer les lipides puis ressortir vers la lumière du vaisseau <sup>235 346</sup> (Figure 15).

Les complications surviennent lorsque les lipides s'accumulent et s'oxydent, transformant alors les macrophages résidents en cellules spumeuses <sup>135,361</sup> qui vont elles aussi commencer à s'accumuler ; le système de régulation classique est alors dépassé. L'inflammation augmente, le recrutement leucocytaire et l'accumulation de lipides aussi <sup>379</sup>. Se forment alors des corps lipidiques extracellulaires. Dans ce processus l'immunité innée n'est pas la seule mobilisée, les cellules dendritiques sont présentes dans la plaque et vont pouvoir présenter des antigènes spécifiques (notamment ceux des ox-LDL) aux lymphocytes T <sup>235</sup>.

Les cellules musculaires lisses participent au processus athéromateux aussi bien dans les premières phases que plus tardivement. Premièrement ces cellules vont migrer de la média vers l'intima, être capturées dans cet espace et commencer à proliférer <sup>126</sup>. Dans un second temps, ces cellules vont passer d'un profil contractile à un profil sécrétoire participant à la progression de la plaque et à l'épaississement de la chape fibreuse (production de collagène, de protéases, de cytokines) <sup>276</sup>.

Les conditions au cœur de la plaque sont propices à l'apoptose et la nécrose. Ces deux morts cellulaires qui vont toucher principalement les cellules spumeuses vont participer à la fragilisation de la plaque et accentuer d'autant plus le recrutement de cellules inflammatoires. De plus, plus la plaque progresse, plus celle-ci se trouve irriguée par de nouveaux vaisseaux, les vasa vasorum, provenant de l'adventice <sup>25,273</sup>. Ces vaisseaux, normalement absents de l'intima sain, sont fragiles et ils vont non seulement augmenter le recrutement inflammatoire mais aussi provoquer des hémorragies intra-plaques, fragilisant ainsi la lésion athéroscléreuse <sup>210,408</sup>.

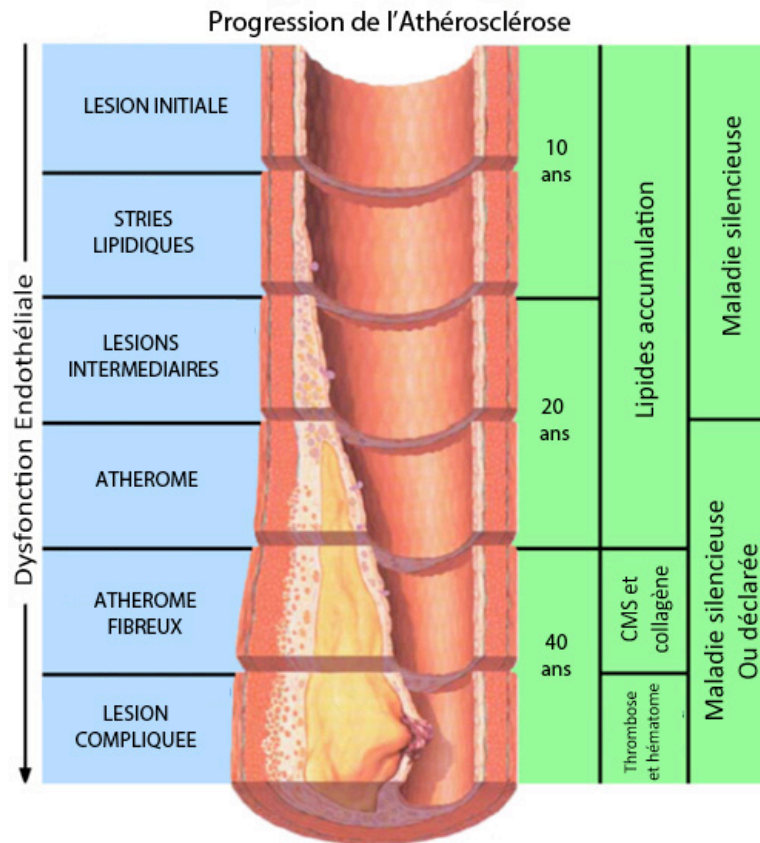


Figure 15 : Progression de la plaque d'athérosclérose (adaptée de wikimedia)

Les plaques d'athérosclérose peuvent être catégorisée en deux <sup>407</sup> (Figure 16) :

- Les plaques stables : chape fibreuse épaisse, petit corps lipidique, peu de nécrose, endothélium présent sur toute la surface de la plaque. Elles ont un faible risque de complications thrombotiques.
- les plaques instables (vulnérables) : large corps lipidique, souvent nécrosées, très fine chape fibreuse pouvant facilement se rompre. Ces plaques ont un fort potentiel thrombotique.

Le passage d'un état stable à instable est possible, il est médié par la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que par la raréfaction des cellules musculaires lisses (mort cellulaire) <sup>61</sup>.

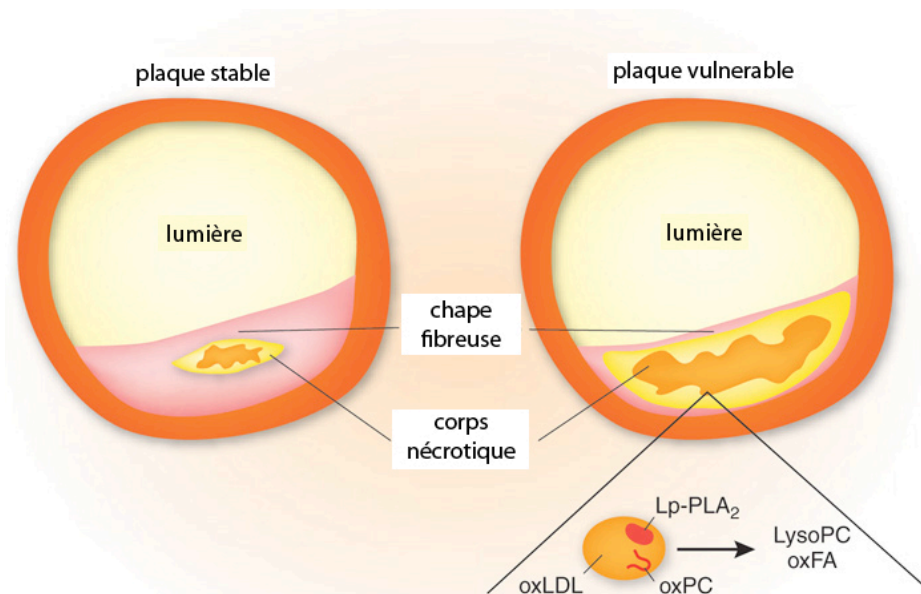


Figure 16 : Plaque stable et plaque instable (adaptée de Webb et al. 2008<sup>420</sup>)

La finalité du processus athéromateux est la formation d'un thrombus dans le vaisseau occluant la lumière et provoquant un défaut d'irrigation des organes en aval. Deux principaux évènements conduisent à l'initiation de la réaction thrombotique :

- L'érosion de la plaque : l'endothélium s'érode, dévoilant les facteurs procoagulants sous-jacents.
- La rupture de plaque : plus subite, cette rupture met en contact direct le sang avec tous les éléments contenus dans la plaque.

## ***B. Les microparticules***

### ***B.1. Définition et Détection***

En 1946, Chargaff *et al* montrent pour la première fois la présence d'un facteur plasmatique, centrifugeable, participant à la coagulation. Ils remarquent alors que lorsque le plasma est dépourvu de cet élément, la coagulation se trouve retardée <sup>71</sup>. C'est la première évidence de l'existence de « microparticules » mais ce ne sera pas avant 1967 que les microparticules seront réellement identifiées. Wolf *et al* montreront que l'activation plaquettaire s'accompagne de la génération de fragments membranaires de taille infra-cellulaire identifiés en microscopie électronique, riches en phospholipides et qui sont le support de la génération de thrombine dans le plasma sans plaquettes <sup>429</sup>. A partir de là, de nombreuses études rapporteront la production *in vitro* de différents types de vésicules ainsi que leur présence dans le plasma humain.

Aujourd'hui différents types de vésicules sont décrites dans la littérature <sup>261</sup> (Tableau 1):

- Les corps apoptotiques :

Ils sont produits lors de l'apoptose et résultent principalement de la déformation et de la fragmentation de la cellule apoptotique. Leurs caractéristiques principales sont : une taille comprise entre 1 et 4µm, une externalisation de la phosphatidylserine et une double membrane perméable. Ils contiennent également de l'ARN et de l'ADN provenant de la fragmentation du noyau.

- Les microparticules :

Ces vésicules peuvent être produites lors de l'apoptose mais sont souvent le reflet d'une activation cellulaire. D'une taille comprise entre 0,1 et 1µm, elles sont plus petites que les corps apoptotiques. Les microparticules sont, de plus, relarguées sans destruction de la cellule qui les produit. Les caractéristiques principales sont l'externalisation de la phosphatidylsérine ainsi qu'une double membrane intègre, non perméable.

- Les exosomes :

Libérés par exocytose, ces vésicules sont produites par des mécanismes très différents de ceux impliqués dans la production de microparticules, ils nécessitent la formation de corps multi-vésiculaires intra-cellulaires qui viendront ensuite fusionner avec la

membrane plasmatique. Leurs caractéristiques principales sont une taille inférieure à 0.1µm, la présence de marqueurs spécifiques comme la protéine TSG101 et une présence faible de phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la double membrane.

	<b>Corps apoptotiques</b>	<b>Microparticules</b>	<b>Exosomes</b>
<b>Taille</b>	1 à 4µm	0,1 à 1µm	<0,1µm
<b>Centrifugation</b>	16000g	20000g	100000g
<b>Origine</b>	Fragments cellulaires	Membrane plasmatique	Corps multivesiculaire / compartiments intracellulaires
<b>production</b>	Apoptose avancée	Activation cellulaire et/ou apoptose précoce	Constitutive ou activation cellulaire
<b>Externalisation phosphatidylsérine</b>	+++	+++	-/+
<b>Marqueurs protéiques</b>	histones	Antigènes de la cellule d'origine	TSG101 CD63

**Tableau 1 : Caractéristiques des différents types de vésicules extra-cellulaires (adapté de Mause and Weber 2010 <sup>261</sup>)**

Différentes méthodes ont été développées pour quantifier et qualifier ces microparticules <sup>203</sup>. De par leur taille, inférieure au micromètre, et leur hétérogénéité de marqueurs, les techniques habituelles doivent être adaptées pour une détection optimale.

De plus, la préparation des échantillons doit être adaptée afin de limiter la génération de microparticules par activation cellulaire ou plaquettaire après prélèvement dans le cas d'échantillon sanguin. L'isolation des microparticules et leur purification requièrent aussi une succession de centrifugations particulières afin de limiter la contamination par d'autres types de vésicules <sup>216</sup>.

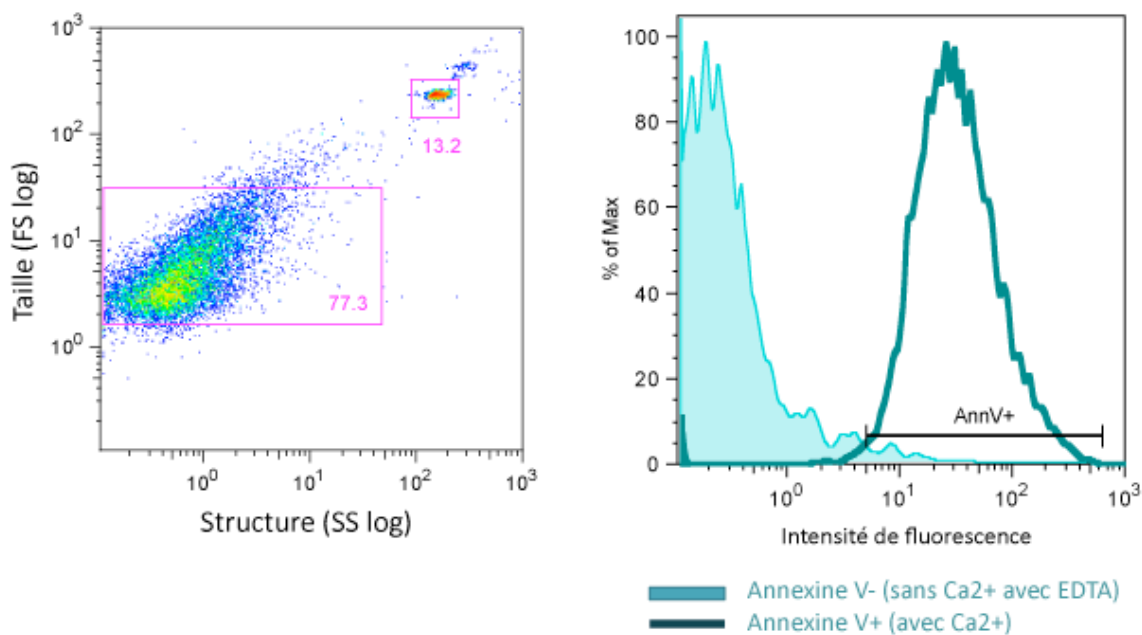


### **B.1.1. Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est la technique la plus répandue à l'heure actuelle de par sa simplicité d'utilisation, sa rapidité d'analyse et sa spécificité. Le principe repose sur l'utilisation de lasers devant lesquels vont passer les éléments contenus dans une solution (que ce soit des cellules, des microparticules, des virus ou encore des billes de polymère). Ces éléments vont passer devant les lasers les uns après les autres grâce à un capillaire et un système fluide particulier.

Ainsi il sera possible de quantifier le nombre d'éléments analysés. De plus, la lumière des lasers va être diffractée et transmise de manière différente en fonction de la taille et de la granulosité de l'élément. Si les éléments ont été préalablement marqués avec une molécule ou un anticorps fluorescent (ou bien s'ils sont fluorescents par nature) il sera possible de les identifier grâce à la longueur d'onde émise par le fluorochrome.

Dans le cas de microparticules, il est possible de définir une zone de taille/granulosité correspondant à la taille des microparticules (Figure 17) grâce à l'utilisation de billes de calibration de taille connue (voir Méthodes p97). Dans cette zone, les microparticules seront identifiées soit par détection du marquage de la phosphatidylsérine par l'Annexine V soit selon leur origine par utilisation d'anticorps spécifiques (Figure 17). Différents marquages utilisant des stratégies de mono ou double-marquage sont utilisés pour différencier les origines cellulaires des microparticules (Tableau 2).



**Figure 17 : Détection et analyse des microparticules par Cytométrie en flux**  
Images obtenues au laboratoire sur un cytomètre EPICS XL, Beckman Coulter

Origine cellulaire	Marqueurs	Références bibliographiques
Cellule endothéliale	CD144	226
	CD146	246
	CD62e	94
	CD31+/CD41-	226 94
	CD105	79
	CD106	195
Plaquette	CD41a	226
	CD42a	205
	CD42b	5
	CD31+/CD42+	195
	CD61	403
	CD62p	322
Leucocyte	CD45	286
	CD11a	246
	CD11b	77
Monocyte	CD14	286 226
Lymphocyte	CD4	286 226 403
	CD8	
	CD20	
Erythrocyte	CD235a	286 226 403
Progéniteurs endothélial	CD34+/KDR+	312

**Tableau 2 : Antigènes utilisés pour la reconnaissance des microparticules**

Cette méthode présente l'avantage d'être quantitative grâce à l'utilisation de billes de quantification qui permettent de s'affranchir des variations de débit

d'aspiration de l'appareil. Cependant elle possède des limitations. La résolution pour les éléments de très petite taille ( $<0.4\mu\text{m}$ ) est faible : de par la longueur d'onde du laser utilisé pour évaluer la taille et la granulosité ; les différences d'indice de réfraction des suspensions contenant les microparticules ; et la possibilité d'avoir des agrégats détectés comme un seul élément <sup>398</sup>. De plus une étude récente a montré que dans certaines pathologies la détection des microparticules par cytométrie peut-être inadaptée car il ne serait pas possible de faire la différence entre complexes immuns et microparticules dans le cas de marquage immunologique <sup>167</sup>. Il est important de noter que ceci ne s'applique que pour des plasmas issus de pathologie inflammatoire chronique où le taux de complexes immuns est élevé. Une étude sur plasma de patient souffrants de syndrome coronaire aigü ne montre aucune incidence de la présence d'éventuels complexes immuns sur le dosage des microparticules par cytométrie en flux <sup>16</sup>.

### **B.1.2. Capture en phase solide**

Cette méthode se base également sur la reconnaissance anticorps/antigène ou Annexine V/Phosphatidylsérine ; l'Annexine V ou les anticorps étant fixés sur un support grâce à une liaison streptavidine-biotine. Les échantillons sont incubés sur ce support et les microparticules sont capturées. La détection se fait ensuite par mesure de leur activité pro-thrombinase due à l'exposition de la phosphatidylsérine <sup>145,203</sup>. Cette technique permet une analyse qualitative des microparticules mais non quantitative. C'est la seule approche mesurant l'activité pro-coagulante des microparticules. Le seuil de détection est bas, ce qui permet une mesure lorsque le taux de phosphatidylsérine est faible. Ce dosage permet d'identifier certaines origines cellulaires en utilisant des anticorps spécifiques.

### B.1.3. Microscopie électronique à transmission

Cette méthode est utilisée pour la visualisation des microparticules <sup>212,226,398,427</sup>. Elle permet d'évaluer la taille des éléments mais aussi la présence d'une double membrane (Figure 18). De plus il est possible de détecter la présence de molécules spécifiques grâce à un marquage immunologique. La détection de la phosphatidylsérine est cependant impossible. De plus, cette technique requiert un nombre initial de microparticules élevé et ne permet pas une analyse quantitative car de nombreuses étapes de centrifugation sont nécessaires lors de la préparation.

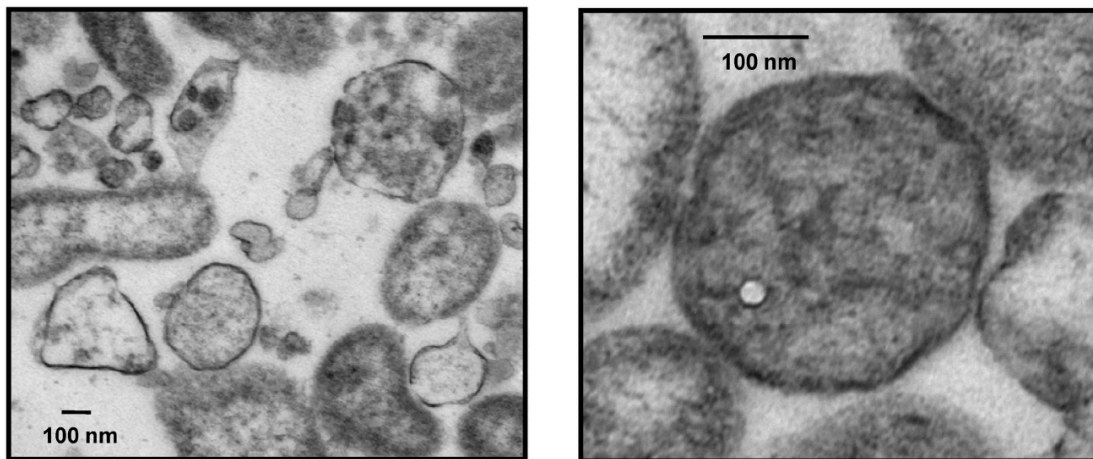


Figure 18 : Exemple de microparticules observées en microscopie électronique à transmission (Burger et al, 2011<sup>54</sup>)

### B.1.4. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. L'analyse de l'élément se fait point par point au moyen d'un balayage via une sonde locale. La résolution est inférieure au nanomètre <sup>33</sup>. Cette technique permet entre autre de travailler sur des solutions aqueuses ce qui permet de conserver les propriétés physiologiques de l'échantillon. Cette méthode est optimale pour la visualisation des microparticules et la mesure de leur taille mais est lourde d'un point de vue technique, ce qui limite son utilisation <sup>223,360,404,440</sup> (Figure 19).

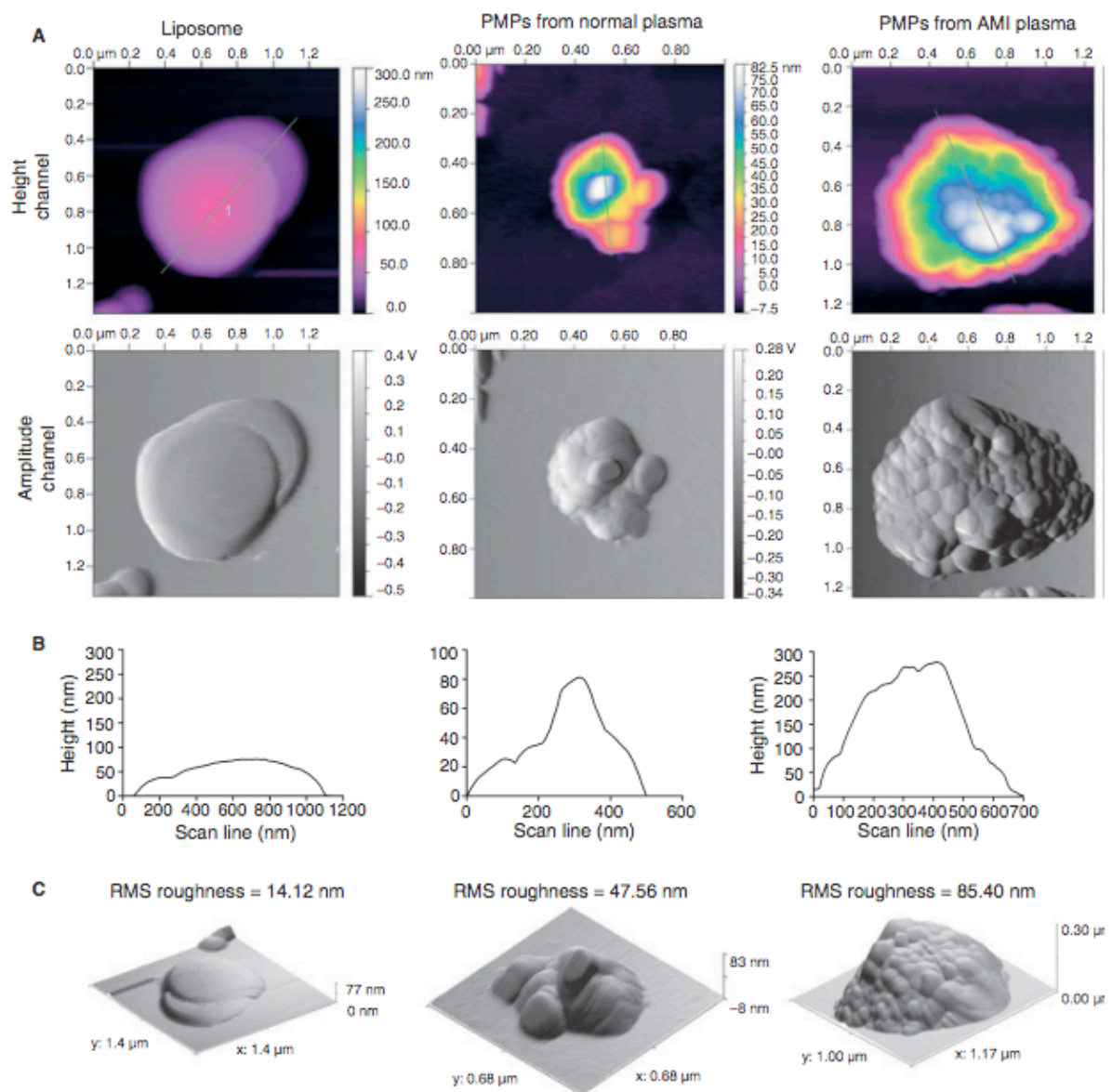


Figure 19 : Exemple de microparticules observées en microscopie à force atomique (leong et al, 2011<sup>223</sup>)

### **B.1.5. Spectroscopie de corrélation photonique (« dynamic light scattering »)**

Cette technique est utilisée pour déterminer le profil de distribution des tailles d'éléments particuliers contenus dans une solution. Brièvement, un laser monochromatique est appliqué sur l'échantillon, les particules contenues vont diffracter la lumière, grâce au mouvement brownien dans l'échantillon la diffraction est fluctuante au cours du temps. C'est l'analyse du changement d'angle et d'intensité de la diffraction qui permet d'établir la taille des éléments contenus <sup>221</sup>.

Cette méthode est, pour l'instant, réservée à des centres spécialisés et équipés. L'avantage est qu'elle permet d'identifier des éléments de taille inférieure à 0.1  $\mu\text{m}$  tel que les exosomes. Il est cependant impossible jusqu'à présent de connaître l'origine cellulaire des éléments ainsi que l'exposition de la phosphatidylsérine.

### **B.1.6. ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay »)**

Cette méthode a été initialement adaptée pour la détection des microparticules d'origine plaquettaire en utilisant un anticorps anti-CD42 <sup>293</sup>. Elle permet une détection de la quantité de marqueur exprimé dans l'échantillon avec une grande sensibilité mais n'apporte aucune information sur la taille des éléments capturés ainsi que sur l'exposition de la PS. C'est pourquoi il faut être prudent dans le cas de la détection de molécules pouvant aussi être des molécules circulantes libres (ICAM ou VCAM soluble par exemple).

Toutes ces méthodes de détection présentent chacune leurs avantages et inconvénients (Tableau 3). Les microparticules sont de plus en plus décrites comme un marqueur potentiel d'une activation ou souffrance cellulaire. Certaines ont une bonne valeur pronostique des pathologies cardiovasculaires (voir paragraphe dédié). Il apparaît donc important de pouvoir mettre en place une méthode standardisée, permettant des résultats comparables entre laboratoires, et simple, pour une future utilisation en clinique. Quelques études montrent déjà l'importance de la méthode de prélèvement et d'isolation de microparticules <sup>203,216</sup>; concernant la méthode d'analyse, le choix dépendra du type d'information voulu, mais la cytométrie en flux se place

actuellement comme une méthode de référence de par les améliorations actuelles des systèmes permettant une meilleure distinction des éléments de petite taille et la possibilité d'identifier simplement l'origine cellulaire des microparticules.

	Taille	Détection phosphatidylsérine	Activité procoagulante	Origine cellulaire	Quantification absolue	Disponibilité/ simplicité
Cytométrie en flux	+	++	-	++	++	++
Capture en phase solide	-	++	++	++	-	++
Microscopie électronique	++	-	-	-	-	+
Microscopie à force atomique	++	-	-	+	++	-
Spectroscopie de corrélation photonique	++	-	-	-	++	-
ELISA	-	-	-	+	-	++

Tableau 3 : Caractéristiques de chaque mode de détection des microparticules

Enfin, à l'heure actuelle, des équipes de recherche travaillent sur la mise en place de nouveaux outils permettant la détection de petites particules.

Le laboratoire de Bruce Furie développe une méthode basée sur l'impédancemétrie, proche de la cytométrie en flux. Les éléments « non conducteurs » contenus dans un liquide vont passer par une ouverture de taille connue et couverte d'électrolytes. Lors du passage de l'élément, la quantité de fluide, conducteur lui, est diminué ce qui réduit la conductance mesurée. L'amplitude de la variation est représentatif de la taille, les pulses de variations du nombre d'évènement. La précision de cet appareil est très bonne pour la mesure de taille comprise entre 20 et 60% de la taille de l'ouverture. A nouveau, la supposition est faite que l'analyse se fait sur des éléments sphériques. Cette méthode peut être couplée par la suite d'une détection de fluorescence comme un cytomètre classique permettant le marquage immunologique des éléments <sup>447</sup>.

Ce nouvel outil est intéressant car ils permettent une meilleure résolution au niveau de la taille et/ou de la forme des éléments détectés. Cependant seule l'équipe l'ayant mis au point le possède actuellement et son utilisation peut se révéler couteuse de part les technologies mise en place et les équipements nécessaires.

## ***B.2. Origines, Formation et Contenu***

Il est communément admis que les microparticules peuvent provenir de tout type cellulaire, aussi bien des cellules circulantes ou composant la paroi du vaisseau que de cellules comme les cardiomyocytes <sup>18</sup> ou les hépatocytes <sup>427</sup>. Les microparticules issues des cellules circulantes et du vaisseau sont celles majoritairement étudiées, on les retrouve dans différentes proportions dans le sang en fonction de leur origine (Figure 20).

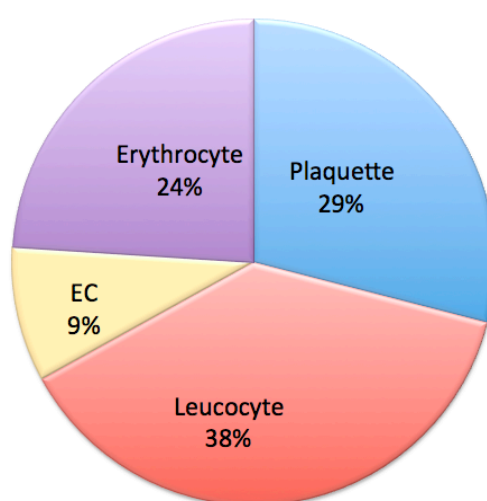


Figure 20 : Diagramme de la répartition des origines microparticulaires retrouvées dans le sang (Leroy et al. 2007<sup>226</sup>)

### **B.2.1. Formation des microparticules**

Des mécanismes communs spécifiques sont essentiels pour cette libération de microparticules. Tout d'abord identifiés dans les plaquettes ces mécanismes regroupent :

- une modification du calcium intracellulaire
- une externalisation de la phosphatidylserine
- un remodelage du cytosquelette

Au repos, les phospholipides membranaires sont répartis de manière asymétrique. En particulier, les phospholipides chargés négativement comme la phosphatidylserine se situent préférentiellement sur le feuillet interne (Figure 21, panel haut). De manière passive, les phospholipides traversent la membrane pour équilibrer



les charges. Le maintien d'un déséquilibre de charge se fait donc grâce à différentes protéines. Les scramblases (dont l'activité est calcium-dépendante) et les floppases (protéines ATP dépendante responsables de l'externalisation de la phosphatidylserine en particulier) sont inactives. Au contraire, les flippases dont le rôle est l'internalisation des phospholipides chargés négativement est activée. Le cytosquelette est alors polymérisé sous la membrane plasmique, favorisant sa stabilité <sup>250</sup>.

Lors d'une activation cellulaire et lorsque le calcium intracellulaire augmente, l'activité flippase est inhibée, les scramblases et floppases sont activées permettant alors l'externalisation de la phosphatidylserine aussi bien de manière active que passive (Figure 21, panel bas). Il est important de noter que certains transporteurs ABC (ATP-binding cassette) participent à cette externalisation grâce à leur activité floppase <sup>99</sup>. En effet les cellules de souris déficientes en ABCA1 externalisent la phosphatidylserine de manière réduite et présentent un taux de microparticules circulantes phosphatidylserine+ diminué également <sup>93</sup>. Dans les plaquettes, cette augmentation du calcium intracellulaire est liée à la mitochondrie et à la libération de cytochrome C <sup>269</sup>.

Concernant le cytosquelette, celui-ci est également modifié par l'activation cellulaire. Différents mécanismes ont été mis en évidence :

- une déstabilisation des filaments d'actine dépendante ou non de l'activité calpaïne <sup>63,97</sup>.
- une réorganisation du cytosquelette grâce au clivage de différentes protéines comme la filamin-1, la gelosin, la talin ou la myosin <sup>345</sup>.
- une contraction de la membrane due à la phosphorylation de la protéine MLC (myosin light chain) activée par Rho kinase sous dépendance des caspases <sup>269,348</sup>.

Là encore, le calcium intracellulaire et les mitochondries jouent un rôle avec l'activation de caspase3 par les calpaïnes (activité calcium-dépendante).

Durant l'apoptose, la vésiculation dépend également de la contraction de l'actine et de la myosine qui est régulée par l'activité caspase 3 suite à l'action de ROCK1/2 <sup>91,348</sup>. L'exposition de la phosphatidylserine et les remaniements du cytosquelette interagissent entre eux. En effet, RhoA module l'activité de SOCE (« store-operated Ca<sup>2+</sup> entry) qui augmente l'externalisation de la phosphatidylserine <sup>269</sup>. Une étude récente a identifié un nouvel acteur dans cette externalisation : la protéine transmembranaire TMEM16F (scramblase calcium dépendante) ; de plus, cette protéine

a été identifié comme cible de mutations chez des patients souffrant d'un syndrome de Scott et ayant un défaut d'activation plaquettaire ainsi qu'un faible taux de microparticules <sup>378</sup>.

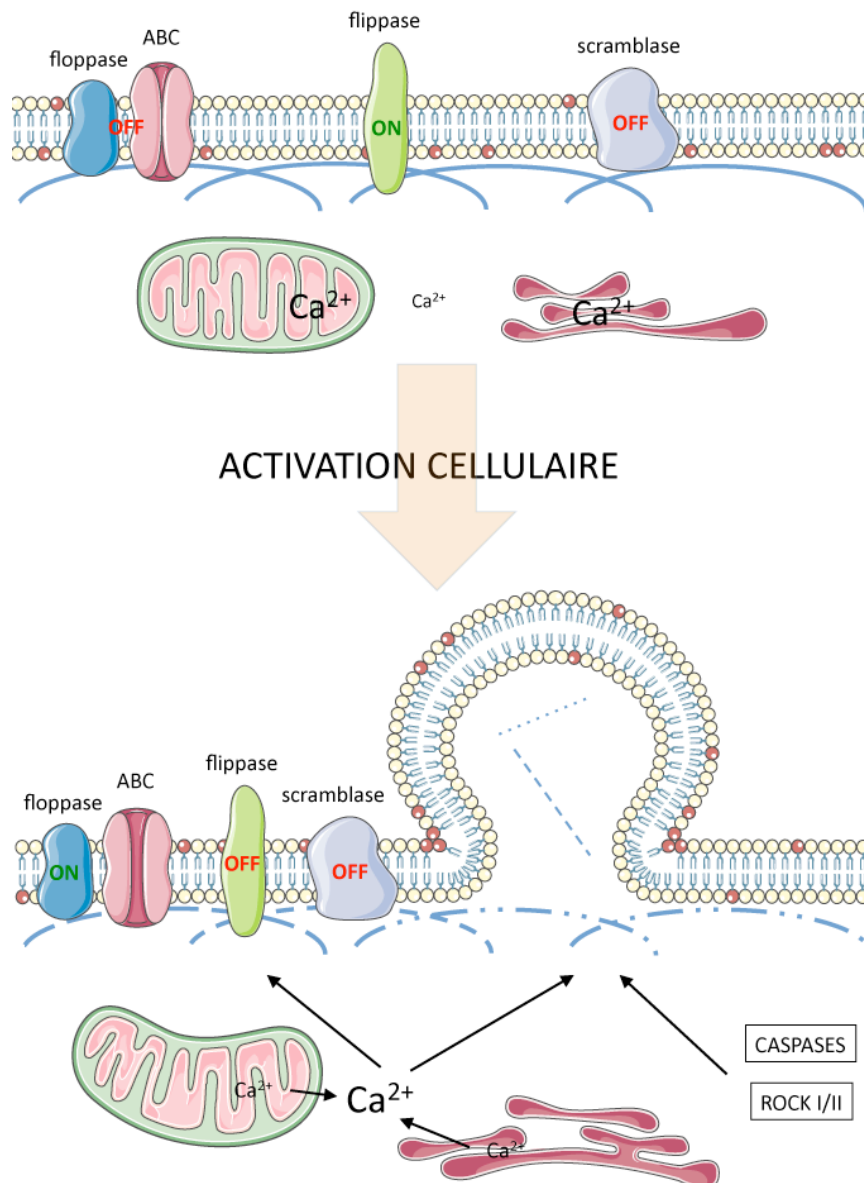


Figure 21 : Mécanismes d'externalisation de la phosphatidylsérine (adapté de huguel 2005<sup>186</sup>)

Bien que décrits comme mécanismes généraux de vésiculation, il est important de rappeler que ces éléments peuvent varier en fonction du type cellulaire ou du stimulus initiateur de la vésiculation.

A ce propos, les stimuli permettant la production de microparticules sont très variés et vont avoir des effets différents en fonction du type cellulaire concerné. Ils peuvent être pro-inflammatoires, pro-apoptotiques, pro-coagulants mais également mécaniques, toxiques ou encore pro-oxydants. Ces différents facteurs sont regroupés

dans le tableau suivant (Tableau 4), séparé en deux parties, l'une regroupant les stimuli pouvant être impliqués dans l'athérosclérose, l'autre présentant d'autres molécules connues.

Partie 1

	Types cellulaires					
	Cellules endothéliales	Plaquettes	Cellules musculaires lisses	Monocytes/macrophages	Erythrocytes	Lymphocytes T
<b>Cytokines pro-inflammatoires</b>	Combes et al <sup>94</sup> Curtis et al <sup>96</sup> Szotowski et al <sup>380</sup>	Nomura et al <sup>289</sup> Piguet et al <sup>311</sup>	Schechter et al <sup>341</sup>	Jungel et al <sup>202</sup>		
<b>Thrombine</b>	Sapet et al <sup>336</sup>	Barry et al <sup>26</sup> Dale et al <sup>98</sup>				
<b>Stress oxydatif</b>	Szotowski et al <sup>380</sup>				Freikman et al <sup>144</sup>	
<b>LDL modifiés</b>	Nomura et al <sup>292</sup>		Llorente-cortes et al <sup>243</sup>			
<b>HDL-cholestérol</b>	Liu et al <sup>239</sup>			Liu et al <sup>239</sup>		
<b>Toxine urémique</b>	Faure et al <sup>134</sup>					
<b>Extrait de cigarette</b>				Li et al <sup>230</sup>		
<b>Concentration d'homocystéine</b>	Sekula et al <sup>350</sup>	Olas et al <sup>298</sup>				
<b>Collagène</b>		Barry et al <sup>26</sup> Boilard et al <sup>42</sup>				
<b>PDGF</b>			Schechter et al <sup>340</sup>			
<b>PAI-1</b>	Brodsky et al <sup>51</sup>					
<b>Ligand Fas</b>			Essayagh et al <sup>131</sup>			
<b>Protéine C activée</b>	Perez-casal et al <sup>308</sup>			Perez-casal et al <sup>308</sup>		
<b>Condition de flux</b>	Vion et al <sup>406</sup>	Nomura et al <sup>289</sup>	Stampfuss et al <sup>371</sup>			

Partie 2

	Types cellulaires
--	-------------------

	Cellules endothéliales	Plaquettes	Cellules musculaires lisses	Monocytes/ macrophages	Erythrocytes	Lymphocytes T
<b>Augmentation du calcium intra-cellulaire</b>		barry et al <sup>26</sup> Chang et al <sup>67</sup> morel et al <sup>271</sup>		neri et al <sup>282</sup> Cerri et al <sup>64</sup> Aharon et al <sup>7</sup>	bevers et al <sup>31</sup> comfuris et al <sup>95</sup> ratajczak et al <sup>324</sup>	
<b>LPS</b>		Larsson et al <sup>219</sup>		gauley et al <sup>151</sup> Gerrits et al <sup>153</sup> Sarkar et al <sup>337</sup>		
<b>Activateurs de PKC (PMA, staurosporine)</b>			schecter et al <sup>341</sup>	mesri et al <sup>264</sup>		Ullal et al <sup>394</sup> Scanu et al <sup>339</sup>
<b>Actinomycine D</b>						martin et al <sup>252</sup>
<b>Déprivation en sérum</b>	mezentsev et al <sup>266</sup>			aharon et al <sup>7</sup>		

**Tableau 4 : Stimuli reconnus pour activer la production de microparticules par les cellules circulantes et de la paroi vasculaire (adapté de Raout et al. 2011<sup>327</sup>).**

### B.2.2. Les mécanismes de production des microparticules endothéliales

Les connaissances actuelles concernant les mécanismes de vésiculation des microparticules endothéliales proviennent essentiellement d'expériences sur cellules endothéliales isolées ou en culture. La génération de microparticules endothéliales par des HUVECs stimulées par du TNF $\alpha$  a été décrite pour la première fois par Combes et al<sup>94</sup>. Tout comme le TNF $\alpha$ , d'autres cytokines inflammatoires<sup>380</sup> sont capables d'induire la génération de microparticules endothéliales *in vitro* ; c'est aussi le cas pour de nombreuses molécules comme les liposaccharides bactériens, les espèces réactives à l'oxygène<sup>380</sup>, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène<sup>51</sup>, la thrombine<sup>336</sup>, la camptothecine<sup>363</sup>, la protéine C-réactive<sup>414</sup> et les toxines urémiques<sup>134</sup> (Tableau 4). À l'opposé, le monoxyde d'azote (NO) diminuerait la production de microparticules endothéliales par un mécanisme impliquant la tetrahydrobiopterine<sup>414</sup>. Malgré cela, les mécanismes précis impliqués dans la génération de microparticules endothéliales *in vivo* restent encore inconnus ; la forte corrélation inverse entre le cisaillement artériel et le taux circulant de microparticules endothéliales chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique terminale suggère un rôle des forces de cisaillement sur la production de microparticules endothéliales, mais le lien de cause à effet n'a pas été établi<sup>47</sup>.

Seules quelques études portent sur les mécanismes moléculaires contrôlant la vésiculation des cellules endothéliales. Une étude, basée sur une analyse génétique, a permis d'identifier un mécanisme particulier induit par la thrombine. Celui-ci dépend de l'activation du facteur de transcription NFκB et de l'activation de la Rho-kinase ROCK II par la caspase-2 en l'absence de mort cellulaire <sup>336</sup> (Figure 22). Ce mécanisme fonctionne en deux étapes : la première phase se produit dès la liaison entre la thrombine et son récepteur PAR-1, la deuxième phase dépend d'évènements transcriptionnels et implique TRAIL/Apo2L, une cytokine appartenant à la superfamille de TNFα <sup>364</sup>. NFκB apparaît alors comme facteur central dans ces deux phases de production des microparticules endothéliales. Ces études de gènes ont également permis d'identifier l'interleukine-1 et son récepteur IL-1R comme cibles supplémentaires dans la production de microparticules endothéliales sous stimulation par la thrombine. Ces interleukines recrutent les protéines adaptatrices TRAF6 et IRAQ1 qui activent à leur tour un mécanisme conduisant à l'amplification de la vésiculation <sup>224</sup>. De ce fait, les médiateurs inflammatoires régulés par la thrombine agissent par un effet autocrine qui amplifie la sécrétion de microparticules endothéliales (Figure 22). Une étude récente montre également un effet synergique de la thrombine et du CD40 ligand sur la production de microparticules *in vivo* et *in vitro* <sup>253</sup>. La question de l'augmentation de la génération des microparticules endothéliales dans un contexte d'inflammation générale reste cependant ouverte. Une étude a identifié la protéine kinase p38 comme une protéine clé dans la production de microparticules endothéliales pro-inflammatoires <sup>96</sup>(Figure 22). Dans cette étude, les microparticules endothéliales libérées suite à une activation par le TNFα augmentent la sécrétion d'ICAM-1 soluble par les cellules endothéliales, ceci met en évidence l'existence d'une boucle paracrine augmentant la réponse des cellules à l'inflammation. Une autre étude, cette fois par stimulation par de l'angiotensine II montre encore que les microparticules fonctionnent en boucle paracrine : l'angiotensine II induit la libération de microparticules endothéliales par activation de la NADPH oxydase, la production de ROS ainsi que par l'activité de RhoA en lien avec les radeaux lipidiques ; ces microparticules produites sont elles aussi capables d'induire la génération de ROS par les cellules endothéliales <sup>54</sup>.

Évènements précoces

Évènements tardifs

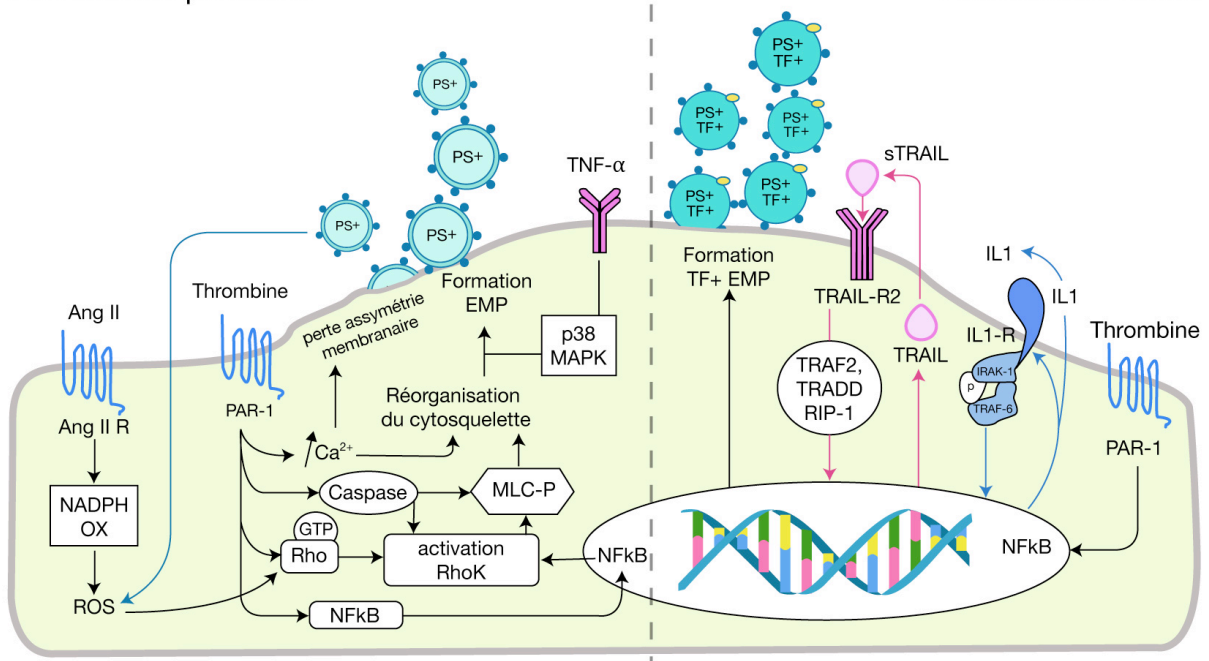


Figure 22 : Mécanismes de production de microparticules endothéliales sous stimulation par la thrombine, le TNF $\alpha$  et l'angiotensine II (adapté de Leroyer 2010)

### B.2.3. Contenu des microparticules

Les microparticules sont le reflet de la cellule dont elles proviennent. Elles contiennent des lipides, des protéines mais aussi des ARN et des micro-ARN <sup>114,261,394,442</sup>. Leurs contenus, et donc leurs effets, sont extrêmement variables. Il est maintenant connu que leurs contenus varient en fonction des stimuli permettant leur génération et non uniquement en fonction du type cellulaire d'origine. Ainsi, les compositions lipidiques peuvent varier et les compositions protéiques également. Par exemple, la comparaison par analyse protéomique de microparticules de monocytes THP1 stimulés par des lipopolysaccharides ou par de la P-sélectine montre une différence dans l'expression de la phosphatidylsérine, dans l'expression de protéines spécifiques de différents compartiments cellulaires (notamment mitochondrial) ainsi que l'expression d'un antigène présent uniquement sous stimulation P-selectine : le « leukocyte-associated immunoglobulin like receptor-1 » <sup>30</sup>.

Les différences de contenu sont cruciales dans la compréhension des effets des microparticules. En effet, des microparticules provenant d'un même type cellulaire mais obtenues par des stimuli différents peuvent avoir des effets diamétralement opposés. Par exemple, les microparticules endothéliales générées par incubation avec du THB4 vont avoir un effet sur l'adhésion de monocytes alors que celles obtenues par stimulation au calcium ionophore seront inefficaces <sup>184</sup>.

En conséquence, bien que *l'in vitro* soit très précieux pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires conduisant à la production de microparticules, il est important de garder à l'esprit que l'effet observé grâce à des microparticules générées *in vitro* peut-être différents de celui observé *in vivo*. Par exemple, les microparticules plaquettaires ont été montrées comme ayant un rôle pro-athérogène grâce à l'utilisation de microparticules générées *in vitro* (voir plus loin), cependant une étude utilisant un plasma enrichi en microparticules plaquettaires ne montre aucun effet pro-athérogène *in vivo* sur des souris déficientes en apolipoprotéineE (ApoE-/-) <sup>188</sup>.

#### **B.2.4. Caractéristiques des microparticules endothéliales**

Les microparticules endothéliales proviennent de la membrane plasmique des cellules endothéliales et portent à leur surface des protéines marqueurs de ces cellules comme la VE-cadherin, PECAM-1, ICAM-1, l'endogline, la E-selectin, la S-endo ou l' $\alpha$ V-intégrine <sup>78</sup>. La NOS endothéliale ainsi que le VEGF-R2 ont été identifiés sur les microparticules endothéliales <sup>225</sup> mais leurs activités n'ont pu être mises en évidence. La E-selectin (CD62E) est exprimée par les cellules endothéliales activées mais elle peut également être retrouvée sur les microparticules endothéliales générées par une activation au TNF $\alpha$  ou par déprivation en facteur de croissance conduisant à l'apoptose <sup>195</sup>.

Les microparticules endothéliales s'accumulent au cours du temps dans le milieu de culture de cellules endothéliales, aussi bien en condition basale que suite à différents stimuli. De plus, la présence de microparticules endothéliales a été identifiée dans le plasma humain et murin <sup>94,386</sup>, l'humeur vitrée de la chambre antérieure de l'œil <sup>66</sup>, l'urine ainsi que dans les lésions inflammatoires comme les plaques d'athérosclérose ou les tissus ischémiques <sup>225,226</sup>. Comme pour les autres types de microparticules, les microparticules endothéliales expriment la phosphatidylsérine à leur surface et lient l'annexine V en présence de calcium. Cependant, des vésicules membranaires annexine V négatives, mais exprimant des marqueurs endothéliaux, ont pu être identifiées dans le plasma humain, suggérant que les microparticules endothéliales pourraient ne pas externaliser la phosphatidylsérine <sup>352</sup>. Une autre hypothèse est que l'annexine V ne pourrait pas se lier à la phosphatidylsérine car le site de liaison serait occupé par une autre molécule. Par exemple la lactadhérine présente dans le sang peut se lier fortement à la phosphatidylsérine et donc limiter l'interaction avec l'annexine V lors du dosage.

Comme expliqué précédemment, la composition protéique des microparticules endothéliales dépend fortement du stimulus qui permet leur production, les protéines actuellement identifiées proviennent principalement de la membrane plasmique, de la fraction cytosolique, du cytosquelette ou des mitochondries <sup>309</sup>. Les microparticules endothéliales, ainsi que les autres types de microparticules, peuvent contenir du matériel nucléaire comme de l'ADN, de l'ARN ou encore des micro-ARN qui pourront être transférés aux cellules cibles. Dans de nombreux cas, le rôle biologique de ce

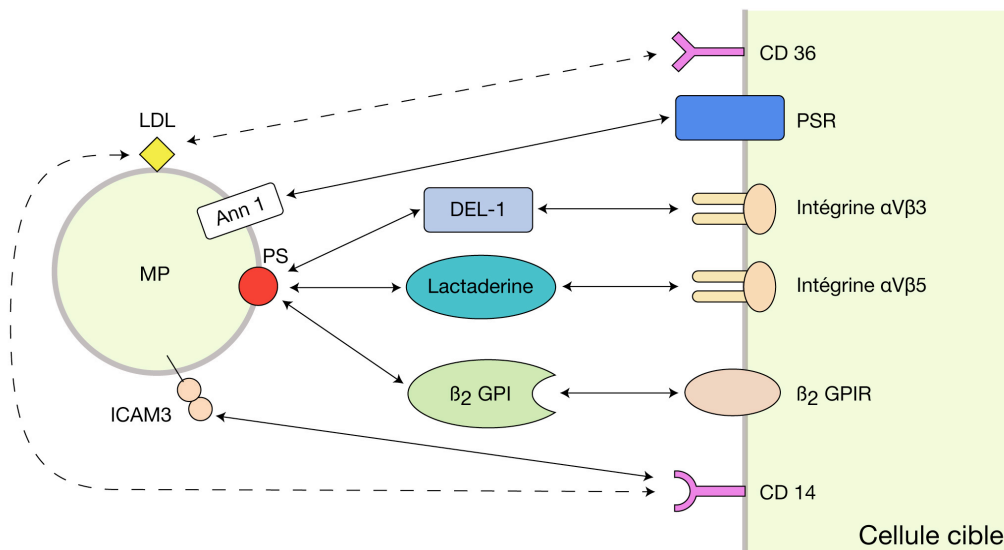


matériel nucléaire reste à déterminer, une étude de Deregibus *et al.* démontre qu'un transfert horizontal d'ARN messager des microparticules endothéliales aux cellules endothéliales active l'angiogénèse à la suite de l'activation d'Akt et de l'expression de la NOS endothéliale <sup>114</sup>. Un transfert de microARN par des vésicules membranaires a également été montré, spécialement pour le microARN-126 et le 143/145, tous deux ayant des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire <sup>174,445</sup>.

### ***B.3. Clairance des microparticules***

Aujourd'hui peu de choses sont connues sur la clairance des microparticules *in vivo*. Au niveau cellulaire les macrophages semblent être les effecteurs principaux de cette clairance grâce à la reconnaissance de la phosphatidylsérine <sup>1,101</sup>. En effet, au niveau du foie (qui participe à hauteur de 45% à la clairance des microparticules) les cellules de Küpffer (cellules macrophages du foie) traitent 90% des microparticules d'origine érythrocytaire contre 8% pour les cellules endothéliales (étude réalisée chez le rat) <sup>424</sup>. De plus, de par leur rôle d'élimination des cellules apoptotiques et débris cellulaires, les systèmes de reconnaissance de la phosphatidylsérine ont été largement étudiés. Les macrophages, tout comme les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes, expriment le récepteur spécifique de la phosphatidylsérine (PSR) permettant la phagocytose des débris cellulaires <sup>132</sup>. Ce récepteur participe à la clairance des microparticules au niveau endothélial par la reconnaissance de l'annexine I <sup>194</sup> et pourrait participer à la clairance des microparticules par les autres types cellulaires l'exprimant. La lactadhérine par sa capacité de reconnaissance de la phosphatidylsérine et de liaison à différentes intégrines a été clairement montrée comme un des mécanismes majeurs d'interaction entre la cellule cible et les microparticules <sup>101</sup>. La glycoprotéine  $\beta 2$ , présente à la surface des macrophages est également capable d'interagir avec les microparticules d'origine plaquettaire de manière dose dépendante et active la phagocytose <sup>1</sup>. Enfin une étude identifie une voie de phagocytose médiée par les IgM spécifiquement (et non par les IgG) <sup>238</sup>. Le CD36, connu pour la reconnaissance des microparticules par les macrophages et pour médier l'effet de ces microparticules, active également la phagocytose <sup>162</sup> et donc pourrait contribuer à la clairance. Enfin, le rôle du CD14 et d'ICAM-3 semble lui aussi important ; CD14 est capable de reconnaître ICAM-3 sur les cellules apoptotiques <sup>115</sup> mais il a également été montré que les microparticules issues de cellules apoptotiques pouvaient exprimer ICAM-3 <sup>387</sup>. En plus de permettre le chemotaxisme des macrophages vers les cellules apoptotiques cela pourrait contribuer directement au mécanisme d'élimination des microparticules. Une étude récente montre que Del-1 (« developpemental endothelial locus 1 »), une glycoprotéine sécrétée par les cellules endothéliales, participe à la clairance des microparticules plaquettaires par l'endothélium vasculaire en reconnaissant la

phosphatidylsérine des microparticules ; le complexe ainsi formé étant ensuite reconnu par les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$  endothéliales <sup>102</sup>.



**Figure 23 : molécules impliquées dans la clairance des microparticules**

D'un point de vue plus systémique, les microparticules présentent une clairance rapide dans l'organisme. L'injection de microparticules plaquettaires chez le lapin <sup>321</sup>, de microparticules érythrocytaires chez le rat <sup>424</sup> ou de microparticules endothéliales chez la souris montre que 80% des microparticules sont éliminées de la circulation dans les 10 minutes suivant l'injection<sup>9</sup>. Chez l'homme, une étude permet d'avoir une idée du temps de clairance ; des plaquettes issues d'aphérèse et contenant de haut taux de microparticules plaquettaires ont été transfusées à des patients souffrant de thrombocytopénie <sup>322</sup>. Leur taux de microparticules aussitôt après transfusion est fortement augmenté comme attendu et diminue de moitié dans les 5 heures suivantes. Ce temps paraît bien plus long que ce qui a pu être observé chez les modèles animaux, cependant il faut garder à l'esprit que pour les modèles animaux des microparticules générées *in vitro* ont été utilisées, le stimulus permettant leur génération influençant la composition il peut de ce fait influencer leurs clairances ; et que pour l'étude chez l'homme les sujets sont malades, leur taux de leucocytes est bas, hors comme expliqué ci-dessus, la clairance des microparticules est en grande partie due à la phagocytose par les macrophages ce qui peut expliquer la réabsorption plus lente des microparticules circulantes.

Lorsque l'on regarde la localisation des microparticules après clairance, celles-ci sont principalement localisées dans le foie (45%) mais aussi assez fortement dans les os (23%) ; on en retrouve également dans la peau (10%), les muscles (6%), la rate (3%) et les poumons (2%) <sup>424</sup>. Le rôle de la rate comme organe de clairance a été suggéré dans une étude sur patients splénectomisés <sup>141</sup>.

## ***C. Microparticules, Endothélium et Athérosclérose***

### ***C.1. Microparticules et traitements cardiovasculaires***

Les traitements médicamenteux affectent, eux aussi, le taux de microparticules circulantes. Cependant l'impact réel d'un médicament sur la vésiculation et la libération des microparticules est difficile à distinguer des effets dus à un meilleur contrôle du développement de la pathologie et des facteurs de risques qui améliorent aussi l'état des cellules et donc diminuent le niveau de microparticules. Après un infarctus du myocarde, des agents antioxydants, comme la vitamine C, modifient les taux de microparticules endothéliales circulantes chez des patients diabétiques et dyslipidémiques <sup>270</sup>. L'effet des statines sur ces taux reste quant-à-lui controversé : d'une part, des doses de statines efficaces d'un point de vue clinique stimulent le détachement endothélial et la génération de microparticules *in vitro* par inhibition de la prenylation <sup>117</sup> ; d'autre part, des données toujours *in vitro*, montrent que les statines peuvent avoir un effet anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales conduisant à une baisse de la vésiculation par inhibition de la voie Rho-kinase <sup>389</sup>. Plusieurs classes thérapeutiques ont réduit le taux de microparticules circulantes dans les maladies cardiovasculaires. Par exemple, des patients diabétiques de type 2 traités par la nifedipine (antagoniste du calcium) ont des taux réduits de microparticules endothéliales <sup>288</sup>. L'administration de benidipine, un autre inhibiteur de canaux calciques, diminue également la concentration en microparticules endothéliales chez des patients diabétiques (type 2) hypertendus <sup>291</sup>. De plus, des patients diabétiques traités par l'acide eicosa-pentaénoïque montrent une baisse significative de leurs taux de microparticules plasmatiques <sup>290</sup>. Chez des patients atteints de syndromes métaboliques, l'administration de pioglitazone diminue les concentrations de microparticules endothéliales <sup>130</sup>. Enfin, une injection intravitréale d'anticorps dirigés contre le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) réduit la production de microparticules endothéliales vitreuses dans des cas de rétinopathie proliférative diabétique <sup>66</sup>. Ces études observationnelles chez l'homme apportent ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de génération des microparticules endothéliales et dans le développement des maladies associées.

## ***C.2. Effets des microparticules dans l'athérosclérose***

### **C.2.1. Les microparticules circulantes**

Le premier effet des microparticules contenues dans le sang circulant que l'on peut identifier est l'effet pro-inflammatoire. De nombreuses études, principalement *in vitro*, montrent que les microparticules circulantes (plaquettaires, et leucocytaires) contribuent à l'inflammation par leur influence sur les interactions cellulaires et la production de cytokines pro-inflammatoires. Elles augmentent la production d'interleukine (IL)-6 et 8 par les cellules endothéliales et leucocytaires<sup>264,265,294</sup>. Elles induisent également l'adhésion des monocytes et l'expression de molécules d'adhésion (en particulier la molécule d'adhésion intracellulaire ICAM-1) à la surface des cellules endothéliales et l'expression du CD11a sur les monocytes (Figure 25)<sup>27,294,369</sup>. Cette augmentation de l'adhésion est en partie médiée par le transfert de RANTES/CCL5<sup>260</sup>. Les microparticules produites à partir de plaquettes apoptotiques induisent également la différenciation des macrophages résidants dans la plaque d'athérosclérose en phagocytes professionnels<sup>404</sup>. Cependant, l'injection *in vivo* d'un plasma enrichi en microparticules plaquettaires n'augmente pas l'adhésion des leucocytes *in vivo* chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>, modèle d'athérosclérose murin) et n'augmente pas non plus le développement des plaques d'athérosclérose<sup>188</sup>.

Cependant, l'action des microparticules étant surtout dépendante de leur origine et du stimulus les produisant, les microparticules circulantes peuvent également avoir des effets anti-inflammatoires. Ainsi, les microparticules d'origine leucocytaire vont prévenir la réponse inflammatoire des leucocytes exposés aux lipopolysaccharides et induire la production de TGF- $\beta$ 1 (« transforming growth factor »), une cytokine anti-inflammatoire<sup>150</sup>. Cet effet est médié par l'exposition de l'annexine 1 par les microparticules (protéine anti-inflammatoire)<sup>100</sup>. *In vitro*, il a également été montré que les microparticules peuvent être internalisées par les monocytes et les lymphocytes B par différents mécanismes et moduler leur activation vers un profil anti-inflammatoire<sup>211</sup>.

L'angiogénèse est une autre cible des microparticules circulantes. Les microparticules plaquettaires ne portent pas directement les MMP contrairement aux

microparticules d'origine endothéliale (voir paragraphe dédié), mais induisent leur production par les cellules cibles dans le cancer de la prostate <sup>103</sup> ; elles pourraient donc avoir un effet pro-angiogénique en induisant la dégradation de la matrice extracellulaire. Un autre type de microparticules participe à l'angiogenèse : les microparticules lymphoïdes portant le « morphogen sonic hedgehog ». Elles stimulent *in vitro* la formation de capillaires en augmentant l'adhésion et l'expression de facteurs proangiogéniques dans les cellules cibles <sup>369</sup>.

Là encore, certains types de microparticules vont avoir un effet inverse, anti-angiogénique. Par exemple, des microparticules lymphocytaires obtenues *in vitro*, réduisent la formation de néo-vaisseau dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris <sup>436</sup>. Cet effet semble médié par le stress oxydatif.

Etant donné l'exposition de la phosphatidylsérine et du facteur tissulaire (TF), les microparticules ont un fort pouvoir pro-thrombotique et pro-coagulant. Elles fournissent, en effet, des phospholipides anioniques nécessaires à l'activation des enzymes de la coagulation et augmentent ainsi la génération de thrombine, elles sont donc très impliquées dans les mécanismes de thrombose. Les microparticules circulantes participent à la thrombose grâce à l'expression du facteur tissulaire et à l'interaction du ligand de la P-sélectine présent sur les microparticules et de la P-sélectine des plaquettes <sup>86,133</sup>. Les microparticules de monocytes générées *in vitro* participent également à l'augmentation du pouvoir pro-thrombotique de l'endothélium par transfert du facteur tissulaire aux cellules endothéliales <sup>7</sup>.

Les microparticules circulantes ont également un rôle dans la détérioration de la fonction vasculaire. Ainsi les microparticules isolées de patients souffrant de diverses pathologies (syndrome coronaire aigu, pré-éclampsie, dysfonction rénale terminale, syndrome métabolique) entraînent une dysfonction endothéliale aiguë sur des anneaux aortiques de rats en diminuant la capacité de relaxation à l'acétylcholine <sup>48,403</sup>. Lorsque que l'on étudie en détail quel type de microparticules est responsable de cet effet, il semble que les microparticules endothéliales soient les principaux acteurs (Figure 25), cependant des études réalisées à partir de microparticules *in vitro* montrent que les microparticules de cellules musculaires lisses, de lymphocytes et endothéliales ont le même effet <sup>252</sup>. Cette dysfonction pourrait être due à une diminution de la production de

monoxyde d'azote (NO) (diminution de l'activité de la NOS endothéliale) ou à une augmentation de l'expression de la cavéoline-1. Les microparticules contribuent aussi à la production d'anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par les cellules endothéliales (*in vitro* et *in vivo*) ; ces anions peuvent découpler la NOS endothéliale et provoquent la transformation du NO en peroxynitrites <sup>149,255</sup>. L'utilisation d'antioxydants, tel que l'enzyme superoxyde dismutase, permet de prévenir cet effet délétère <sup>149</sup>. De plus, les microparticules érythrocytaires générées par stockage du sang provoquent une dysfonction endothéliale en accélérant la réaction entre le NO et l'hémoglobine <sup>125</sup>, le NO pouvant se lier au fer de hème. Les patients avec un sepsis sévère présentent un taux de microparticules circulantes élevé, particulièrement riche en microparticules endothéliales et plaquettaires. De plus, ces microparticules augmentent la contraction vasculaire en augmentant la production de thromboxane A2 <sup>277</sup>. Des résultats obtenus *in vitro* confirment cette observation en démontrant que les microparticules plaquettaires peuvent synthétiser le thromboxane A2 et ainsi augmenter la contraction d'artères pulmonaires de lapin <sup>310</sup>. Cependant, une étude réalisée à partir de microparticules circulantes issues de patients cirrhotiques montre que le transfert de phospholipides par les microparticules active la cyclooxygenase-1, produisant des prostanoïdes vasodilatateurs qui bloquent alors la réponse vasoconstrictive aux catécholamines, contribuant de ce fait à l'hyporéactivité vasculaire observée dans cette pathologie <sup>325</sup>.

Les microparticules circulantes ont aussi une capacité à induire l'apoptose. En effet, il a été montré que les microparticules plaquettaires, possédant une activité NADPH oxydase, produisent des péroxynitrites ce qui induit une apoptose endothéliale <sup>149</sup>. Les microparticules issues de monocytes THP-1 ont également un effet pro-apoptotique sur les cellules endothéliales *in vitro* <sup>7</sup>.



### C.2.2. Les microparticules de plaques

On trouve une grande concentration de microparticules de différentes origines dans la plaque d'athérosclérose (Figure 24). Ces plaques contiennent majoritairement des microparticules d'origine leucocytaire, reflétant l'inflammation locale <sup>226</sup>. Les effets de ces microparticules ont également été largement étudiés.

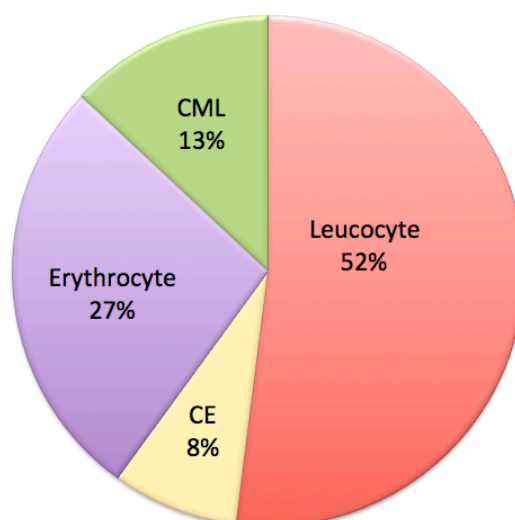


Figure 24 : Diagramme des origines cellulaires des microparticules de plaque d'athérosclérose (Leroy et al, 2007<sup>226</sup>)

Tout comme certaines microparticules circulantes, elles vont avoir un effet pro-inflammatoire. Elles conduisent à une augmentation de l'expression d'ICAM-1 au niveau endothélial et au recrutement leucocytaire <sup>326</sup>. Elles expriment aussi le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ainsi que différentes molécules de co-stimulation comme le CD40 ligand. Elles sont capables d'activer les lymphocytes T, qui à leur tour activeront les lymphocytes B pour produire des immunoglobulines spécifiquement dirigées contre les antigènes de la plaque (la phosphatidylcholine ou encore les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées)) <sup>227,262</sup>. Enfin, ces microparticules portent une enzyme catalytiquement active : l'enzyme de conversion du  $\text{TNF}\alpha$  (TACE/ADAM17), ce qui augmente la libération de  $\text{TNF}\alpha$  au sein de la plaque <sup>57</sup>, renforçant ainsi son caractère pro-inflammatoire.

Ces microparticules vont aussi contribuer à la formation de néovaisseaux dans la plaque, la rendant plus vulnérable. Les plaques vulnérables sont caractérisées par une

abondance accrue de *vasa vasorum*, ainsi que par de fréquentes hémorragies intra-plaques. Il a été montré que les microparticules de plaque induisent l'angiogenèse *in vivo* grâce à leur capacité à lier le CD40 endothélial <sup>227</sup>. De plus, cette néovascularisation ne peut se faire que si la matrice extracellulaire est dégradée autorisant l'insertion de nouvelles cellules endothéliales ; or les microparticules de plaques présentent aussi une activité protéase de part la présence de TACE/ADAM17 mais également de différentes métalloprotéinases de matrice (MMP) <sup>57</sup>. Elles concourent donc à la l'angiogenèse intra-plaque.

Il a été montré que les microparticules de plaque expriment la phosphatidylsérine et fortement le facteur tissulaire <sup>247</sup> et leur capacité thrombogénique est deux fois plus élevée que celle des microparticules plasmatiques <sup>226</sup>. Cela leur confère donc un pouvoir pro-coagulant élevé. Il semble, de plus, que les microparticules exprimant le facteur tissulaire proviennent des cellules apoptotiques de la plaque <sup>247</sup>.

### C.2.3. Les microparticules endothéliales

Parmi les microparticules circulantes et contenues dans la plaque, les microparticules d'origine endothéliale ont un rôle particulier et vont moduler beaucoup d'effets impliqués dans les pathologies vasculaires (Figure 25).

Grâce à l'expression de la phosphatidylsérine, les microparticules endothéliales peuvent se fixer aux facteurs de coagulation et les activer, conférant ainsi un potentiel procoagulant aux microparticules. De plus, les microparticules endothéliales présentent également à leur surface le facteur tissulaire, initiateur de la voie de coagulation extrinsèque <sup>94</sup>. La capacité des microparticules endothéliales à induire la génération de thrombine a été démontrée pour la première fois en utilisant des cellules endothéliales en culture ; un taux élevé de microparticules endothéliales générées *in vitro* réduit le temps de coagulation. L'activité thrombogénique des microparticules endothéliales a été confirmée en montrant que les microparticules endothéliales provoquent la formation de thrombine de manière dépendante du facteur tissulaire et déclenchent la formation du thrombus *in vivo* <sup>3</sup>. De plus, les microparticules endothéliales portant le facteur tissulaire et exprimant des molécules d'adhésion endothéliales peuvent se lier à d'autres types cellulaires comme les monocytes et ainsi transférer leur facteur tissulaire actif *in vitro* <sup>334</sup>. Les microparticules endothéliales peuvent aussi avoir un effet procoagulant indirect en stimulant l'expression et l'activité FT dans les monocytes <sup>334</sup>. Un transfert du facteur tissulaire des microparticules endothéliales vers les plaquettes pourrait aussi être impliqué dans cette réponse procoagulante car ce mécanisme a été démontré pour les microparticules leucocytaires <sup>111</sup>. En exposant la phosphatidylsérine et le facteur tissulaire, les microparticules endothéliales se comporteraient donc comme un vecteur biologique contribuant au risque accru de thrombose. Cependant, des études récentes ont démontré que les microparticules endothéliales peuvent aussi exprimer le récepteur de la protéine C et ainsi avoir des propriétés anticoagulantes <sup>307,308</sup>, suggérant un rôle de microparticules endothéliales dans l'équilibre pro-/anti-coagulation. Enfin, les microparticules endothéliales se comportent également comme un support pour la génération de plasmine en exprimant l'activateur de plasminogène de type urokinase et son récepteur <sup>217</sup>, ce qui leur confère des propriétés fibrinolytiques et un rôle dans la dissolution du caillot.

Tout comme les microparticules leucocytaires et plaquettaires les microparticules endothéliales participent à l'inflammation en induisant la production de cytokines inflammatoires, notamment d'IL-6 <sup>96</sup>. L'augmentation de l'adhésion est aussi médiée par l'acide arachidonique et les phospholipides oxydés présents dans les microparticules <sup>184</sup>. Les cellules endothéliales peuvent également activer les monocytes par libération de microparticules portant le facteur de von Willebrand. Les microparticules endothéliales vont également jouer un rôle sur la maturation des cellules dendritiques, induisant là encore la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) ; cet effet est spécifique des microparticules endothéliales puisque celles d'origine plaquettaire ou lymphocytaire sont inactives <sup>17</sup>. De plus, l'interaction entre des microparticules endothéliales et des cellules endothéliales « naïves » déclenche une réponse pro-inflammatoire démontrée par une augmentation de l'expression de l'ARNm d'ICAM-1 et par une augmentation de la libération d'ICAM-1 soluble par les cellules cibles. Cet effet paracrine des microparticules est influencé par les conditions de génération des microparticules car des microparticules endothéliales provenant de cellules non stimulées ne provoquent pas une telle augmentation. Ces données permettent donc d'identifier les microparticules endothéliales comme une cause et une conséquence de la réponse inflammatoire.

Les microparticules endothéliales sont également produites dans les zones ischémiques de l'organisme. Leroyer *et al* ont montré que ces microparticules formées localement, pouvaient avoir un rôle pro-angiogénique en augmentant la revascularisation post-ischémique dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris <sup>225</sup>. Les microparticules contenues dans la patte ischémique proviennent principalement des cellules endothéliales et sont capables d'induire *in vitro* la différenciation de progéniteurs endothéliaux en cellules endothéliales et augmentent leur potentiel pro-angiogénique *in vivo*. De plus, dans les tissus ischémiques les microparticules peuvent transférer des ARN messagers des progéniteurs vers les cellules endothéliales quiescentes, activant ainsi les mécanismes d'angiogénèse <sup>114</sup>. Les microparticules portent également des facteurs protéolytiques comme la plasmine, les MMP-2 et 9 ainsi que la protoenzyme MT1-MMP, cette plasmine active les métalloprotéases de matrice ou/et d'autres protéases appartenant à la même famille provoquant ainsi la dégradation de la matrice interstitielle permettant ainsi la migration cellulaire et la formation de

nouveaux vaisseaux <sup>217,383</sup>. Malgré ces effets clairement pro-angiogéniques, il est à noter que des microparticules endothéliales obtenues *in vitro*, réduisent la formation de néo-vaisseau dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris <sup>266</sup>. Cet effet semble médié par le stress oxydatif tout comme pour les microparticules lymphocytaires.

Il a été mentionné que les microparticules circulantes peuvent avoir un effet pro-apoptotique. De manière intéressante, il semble que les microparticules endothéliales puissent jouer un rôle contraire. En effet, les microparticules produites par l'endothélium peuvent être un moyen d'évacuer la caspase-3 (qui se retrouve piégée dans les microparticules), diminuant ainsi le taux intracellulaire et prévenant l'apoptose de la cellule mère <sup>43</sup>. En plus de cela, les microparticules portent également différents facteurs anti-apoptotiques comme le récepteur de la protéine C ou la protéine C activée qui ont des effets sur la survie cellulaire par cytoprotection <sup>4,6</sup>. De plus, les microparticules endothéliales (obtenues par déprivation) vont être intégrées dans les cellules endothéliales par liaison phosphatidylsérine-Annexine 1 et inhiber l'activation de p38, prévenant l'apoptose <sup>194</sup>.

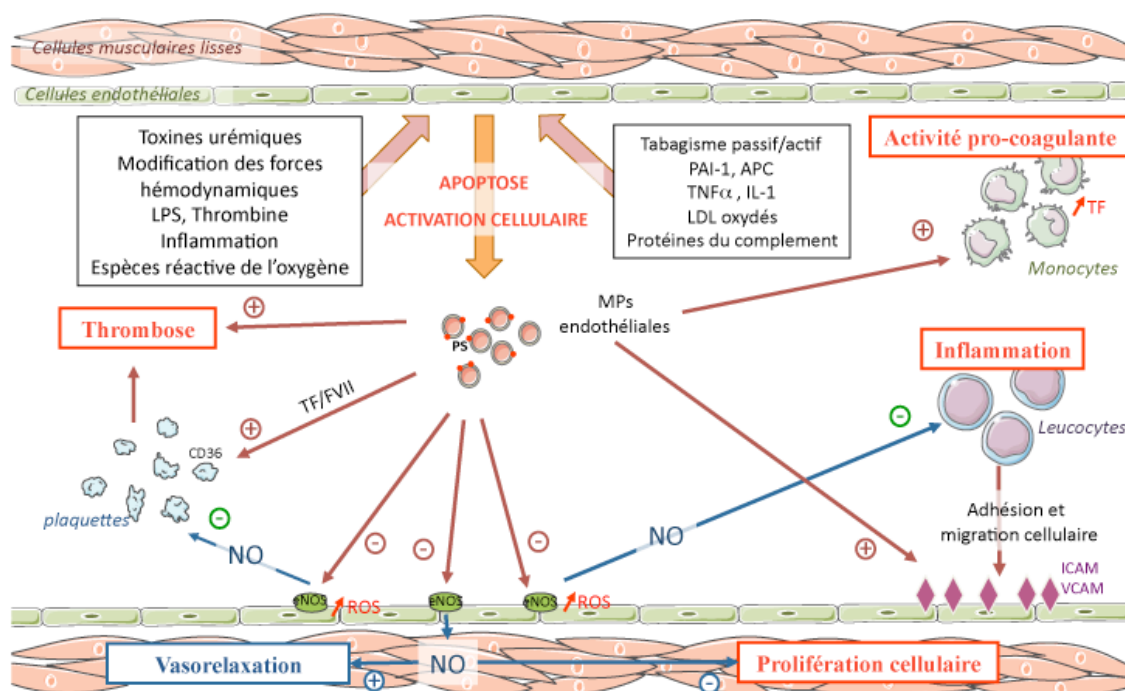


Figure 25 : Effets délétères des microparticules endothéliales (adapté de Amabile et al, 2010<sup>15</sup>)

Enfin, il a été rapporté que les microparticules renferment divers microARN (matures et immatures) <sup>128,187</sup> et le contenu peut être différent de celui de la cellule mère en fonction du stimulus, ainsi elles peuvent être enrichies spécifiquement en un ou plusieurs microRNA <sup>118</sup>. Certains de ces microRNA ont des effets athéro-protecteurs. En inhibant l'expression de la protéine RGS16 (régulateur de la signalisation de la protéine G 16), le microARN-126 conduit à l'augmentation de l'expression de CXCR4 et CXCL12. L'injection de microparticules enrichies en microARN-126 permet donc de limiter la progression de la taille de la plaque d'athérosclérose, d'augmenter sa stabilité et d'augmenter le recrutement de progéniteurs Sca-1+ <sup>445</sup>. Les microparticules produites par les cellules endothéliales soumises à un flux ou surexprimant KLF2 sont enrichies en microRNA-143/145 et contrôlent l'expression génique des cellules musculaires lisses sous-jacentes dans un modèle de co-culture. Ces microparticules réduisent également la formation de plaque d'athérosclérose chez des souris ApoE déficientes <sup>174</sup>.

Ainsi il est clairement montré dans la littérature, que les microparticules et en particulier les microparticules endothéliales peuvent aussi bien avoir des effets délétères que bénéfiques, tout dépend des stimuli de génération, de la composition (Figure 26) et du lieu d'action de ces microparticules. Il est important de noter que la plupart des études montrant les effets des microparticules utilisent des microparticules générées *in vitro* par des stimuli parfois loin de la physiologie. L'effet observé est donc à associer avec le modèle utilisé.

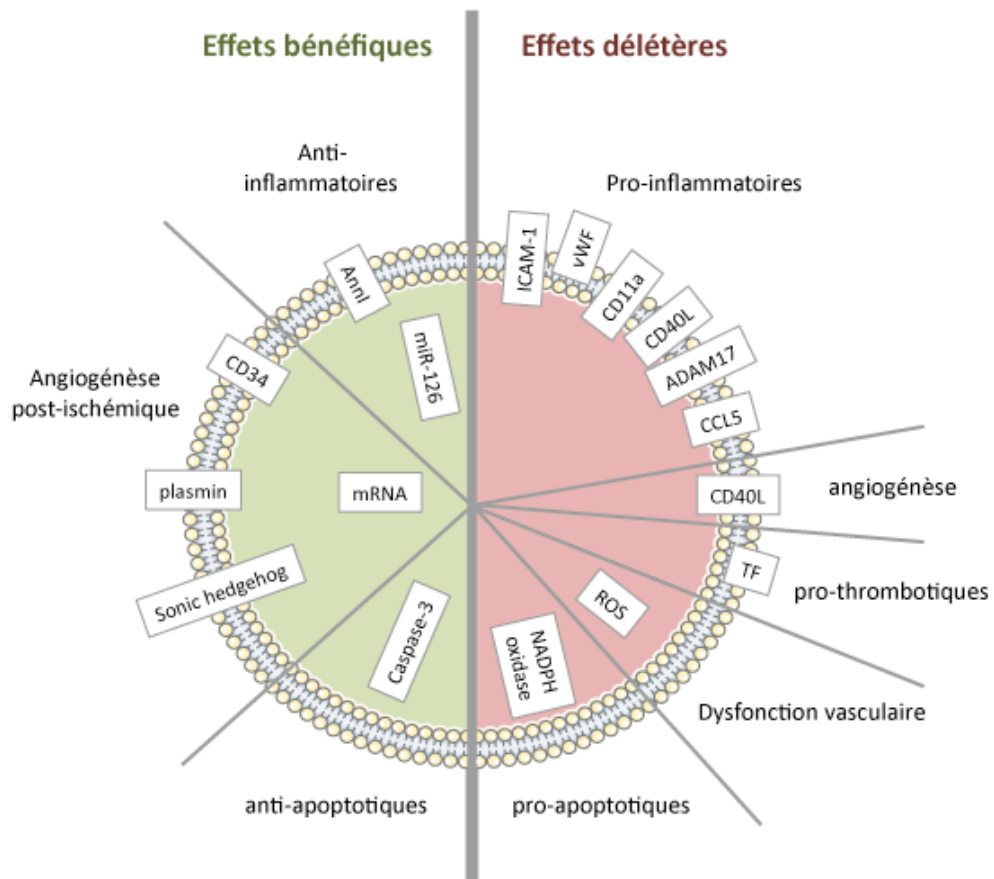


Figure 26 : Effet des microparticules en fonction de leur contenu

### C.3. Microparticules et chronologie de l'athérosclérose

Les microparticules circulantes et contenues dans la plaque d'athérosclérose ont donc des effets biologiques divers, négatifs ou positifs au regard de la pathologie de l'athérosclérose. Bien que le rôle de chaque type de microparticules dans le développement de la pathologie n'ait pas été clairement établi, il est possible d'identifier leur contribution à chaque étape à partir des différentes études *in vitro* et *in vivo* présentées précédemment. Ce dernier paragraphe résume donc l'implication potentielle des microparticules à chaque étape de la pathologie.

Tout d'abord, il a été montré dans cette introduction que les facteurs de risques cardiovasculaires comme la cigarette ou le cholestérol contribue à la production de microparticules, notamment de microparticules endothéliales. Ces microparticules apparaissent donc comme un reflet de la souffrance vasculaire mais sont aussi un acteur de la dysfonction, en inhibant notamment la production de NO par l'endothélium (microparticules endothéliales et leucocytaires) soit par production de radicaux libres, soit par surexpression de cavéoline-1 ou encore par diminution de l'expression de la NOS endothéliale ou de sa phosphorylation. Elles peuvent également agir directement sur la contraction des cellules musculaires lisses (Figure 27).

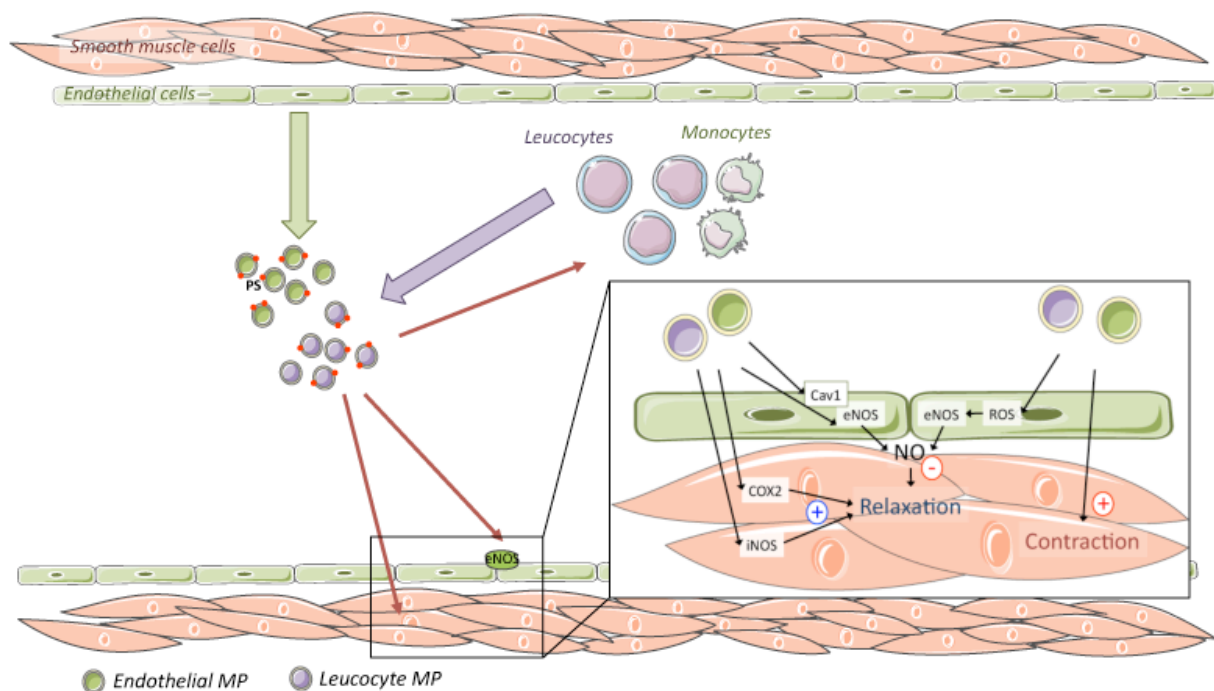


Figure 27 : Etape 1, dysfonction endothéliale (adaptée de Rautou et al 2011<sup>327</sup>)



Les microparticules endothéliales peuvent, de plus, contribuer à l'apoptose endothéliale ainsi qu'à l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les récepteurs correspondants par les leucocytes. Concernant l'effet des microparticules circulantes sur la perméabilité, les études sont un peu moins précises mais il semble y avoir des liens forts entre génération de microparticules et augmentation de la perméabilité, les deux ayant des effecteurs communs dans la cellule endothéliale (p38 et ROCK) <sup>96,395,396</sup>. Ainsi les microparticules joueraient un rôle dans les quatre paramètres clé amorçant la formation des plaques d'athérosclérose : perte de la vasodilatation, augmentation de la mort cellulaire, augmentation du profil pro-inflammatoire et de la perméabilité (Figure 25).

En deuxième lieu, alors que les lipides et les monocytes ont commencé à s'accumuler dans l'intima, les microparticules vont participer à l'amplification du phénomène. Cette fois-ci, ce sont les microparticules contenues dans la plaque et principalement générées par les monocytes-macrophages en réponse aux LDL qui vont augmenter l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E et P-sélectine) par les cellules endothéliales (soit par transfert, soit par synthèse) et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, induisant un recrutement plus massif (Figure 28).

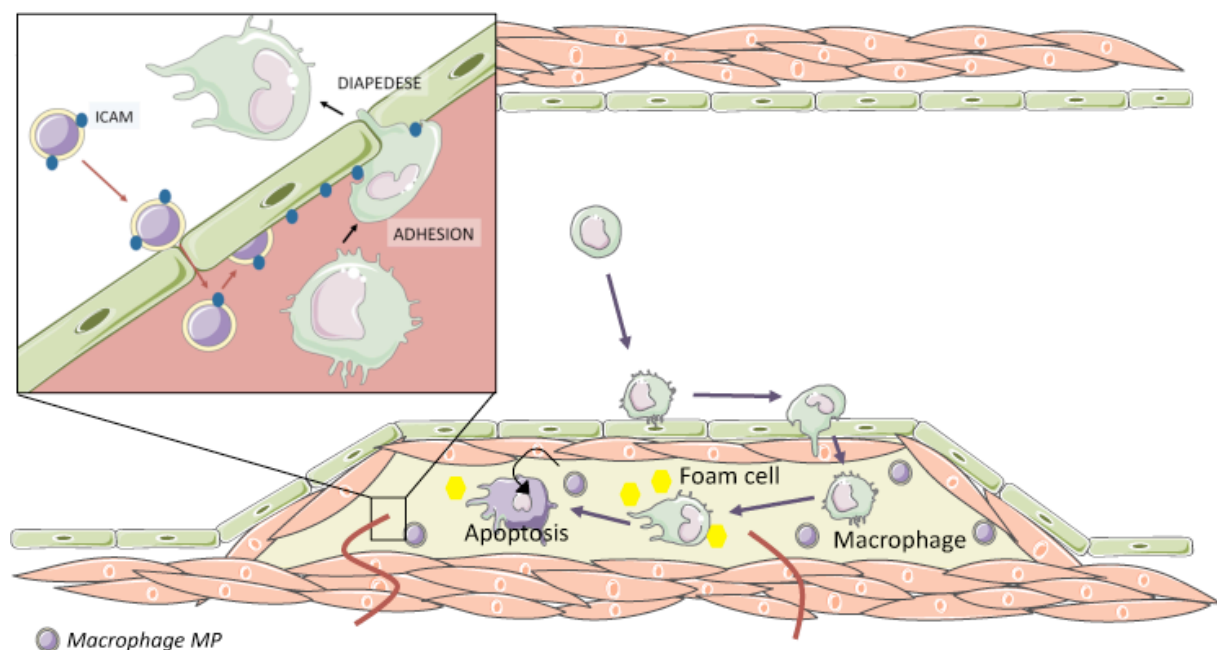


Figure 28 : Etape 2, recrutement et progression (adaptée de Rautou et al 2011<sup>327</sup>)

Il est à noter que les HDL ont un effet contraire aux LDL sur l'inflammation, puisqu'ils vont prévenir l'interaction entre microparticules de lymphocytes T et cellules endothéliales <sup>58,339</sup>. Les microparticules peuvent, de plus, induire l'apoptose des macrophages <sup>185</sup>, cependant cet effet n'est pas observé pour des microparticules isolées de plaques humaines (données non publiées S. Pégorier, Inserm U970 équipe1). En particulier, il semble que les microparticules de lymphocytes T leucémiques (cellules de jurkat) agissent par transfert de caspase-3 <sup>124</sup> et augmentation de lipides intracellulaires <sup>185</sup>. Un autre cercle vicieux est alors activé : les macrophages apoptotiques libèrent davantage de microparticules, qui vont avoir un effet paracrine sur les cellules voisines (Figure 28).

Toujours dans la progression de la plaque, les microparticules (en fonction de leur origine) vont avoir un effet délétère sur les cellules musculaires lisses en induisant leur prolifération et leur mort. Bien que ceci n'ai jamais été clairement démontré, les microparticules de plaques pourraient avoir un rôle dans la migration des cellules musculaires lisses <sup>226</sup>. De même il serait intéressant de connaître l'effet des microparticules de plaque sur le passage du profil contractile au profil sécrétoire de ces cellules. Enfin, les microparticules de plaque contribuent à la formation de *vasa vasorum* intra-plaque par stimulation de l'angiogénèse (microparticules CD40L+), rendant celle-ci plus fragile (Figure 29). La fragilité est également augmentée par effet des microparticules portant des protéases actives comme TACE/ADAM17 ou MMP 2 et 9.

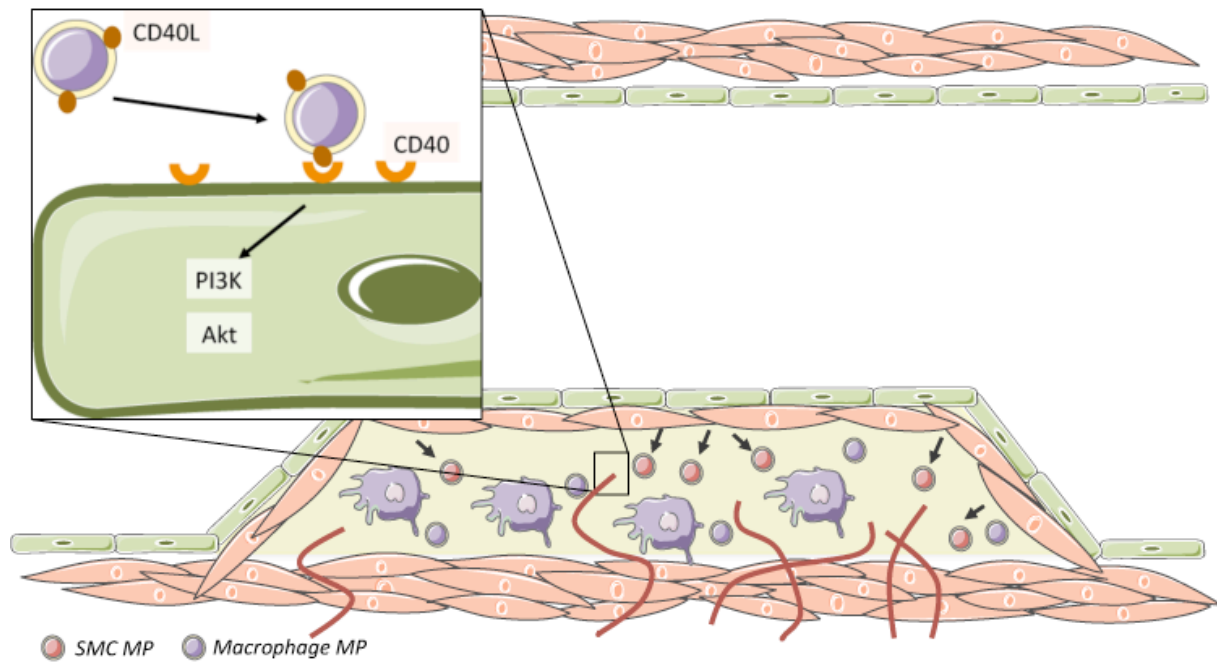


Figure 29 : Etape 3, progression et fragilisation (adaptée de Rautou et al 2011<sup>327</sup>)

Les manifestations cliniques telles que l'infarctus ou l'ischémie du membre inférieur surviennent lorsque la plaque s'érode ou se rompt. Pour l'instant le rôle des microparticules sur l'érosion endothéliale n'a pas été déterminé. On sait simplement que les microparticules circulantes de diverses origines contribuent à l'apoptose endothéliale, ceci pouvant provoquer une desquamation endothéliale. Les microparticules de plaque ont un profil pro-thrombotique bien plus important que les microparticules circulantes et vont donc avoir un rôle d'initiateur de la thrombose lorsque la plaque se rompt et met en contact microparticules intra-plaques, plaquettes et microparticules plaquettaires (Figure 30).

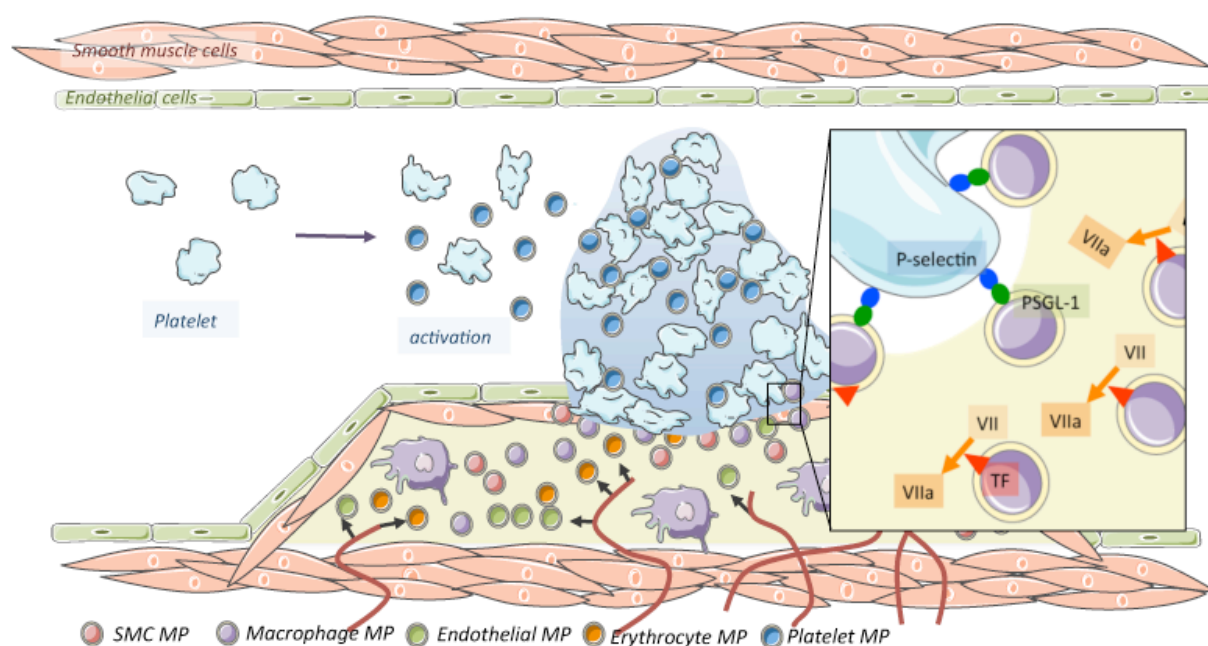


Figure 30 : Etape 4, rupture et thrombose (adaptée de Rautou et al 2011<sup>327</sup>)

Pour conclure, il est important de souligner les effets bénéfiques de certains types de microparticules. En effet de part leur potentiel pro-angiogénique, elles vont pouvoir faciliter la revascularisation post-ischémique. Certaines microparticules portent également des inhibiteurs de la coagulation et des agents fibrinolytiques, participant à l'arrêt de la thrombose et à la dégradation du thrombus.

#### ***C.4. Microparticules endothéliales et valeur pronostique***

Bien que les microparticules endothéliales soient une sous-population mineure des microparticules circulantes (Figure 20), la variation de leur concentration peut apporter des informations cliniques importantes aussi bien chez les sujets sains que chez les patients atteints de troubles cardiovasculaires <sup>78</sup>. Chez les patients présentant une dysfonction endothéliale, les taux de microparticules endothéliales circulantes sont inversement corrélés à l'amplitude de dilatation induite par le débit, indépendamment de l'âge et de la pression artérielle du patient <sup>12,130,423</sup>. De plus, une atteinte aiguë de l'endothélium comme celle induite par le tabagisme passif réduit la fonction endothéliale et augmente le taux de microparticules endothéliales circulantes chez de jeunes sujets sains <sup>173</sup>. Les microparticules endothéliales apparaissent donc comme un marqueur de l'activation de l'endothélium.

On s'intéresse également à des stratégies de multi-marquages combinant les taux de microparticules endothéliales et ceux de cellules progénitrices endothéliales ; ces derniers pourraient être utilisés comme marqueurs intégratifs de la santé vasculaire. Une modification du rapport des concentrations de microparticules endothéliales /cellules progénitrices endothéliales serait le reflet d'un déséquilibre entre lésion et réparation de l'endothélium, ce rapport permettrait d'identifier les patients ayant des vaisseaux dysfonctionnels <sup>312,333</sup>.

Jusqu'ici, seules quelques études ont étudié le rôle pronostique potentiel de la mesure de la concentration plasmatique de microparticules endothéliales. Chez des patients ayant un accident ischémique aigu, le taux de microparticules endothéliales est associé à la taille de la lésion ainsi qu'au résultat clinique mais aucun suivi n'a été fait concernant les incidents cliniques <sup>362</sup>. Chez des patients souffrant d'hypertension pulmonaire la concentration circulante de microparticules endothéliales exprimant la E-sélectine permet de prédire le suivi des malades sur un an <sup>14</sup>. Pour les sujets avec un haut risque de maladie coronaire, le taux basal de microparticules endothéliales exprimant, cette fois, la VE-cadhérine prédit la survie du patient indépendamment du score de Framingham, du taux de CRP (protéine réactive C) ou du niveau de peptide natriurétique BNP <sup>295</sup>. Des résultats similaires ont été observés dans le cas de la défaillance rénale chronique, où de hauts taux de microparticules endothéliales CD31+CD41- apparaissent comme facteur prédictif indépendant de la mort

cardiovasculaire, alors que les autres sous-populations de microparticules plasmatiques<sup>185</sup> n'ont pas cette valeur pronostique. Ces résultats suggèrent une utilisation possible du taux de microparticules endothéliales circulant comme biomarqueur pour la stratification des patients et l'identification des sujets à haut risque cardiovasculaire.

## Travaux de thèse

## ***A. Objectifs – Hypothèses de travail***

A ce jour, les mécanismes de génération de microparticules endothéliales ont été essentiellement étudiés *in vitro*, et impliquent l'activation des caspases et de différentes kinases (Rho- et MAP-kinase) lors de stimulations pro-inflammatoires (voir Chapitre B.2.2. page 51) <sup>119</sup>. Cependant, on ne connaît pas encore les déterminants de la génération *in vivo* des microparticules endothéliales, ni les mécanismes mis en jeu. Notre équipe avait montré il y a quelques années qu'il existait une relation inverse entre le degré de cisaillement et le taux de microparticules endothéliales circulantes chez des patients atteints de défaillance rénale terminale<sup>47</sup> et ce, indépendamment de l'âge et de la pression artérielle. Des taux élevés de microparticules épithéliales ont également été trouvés chez des patients atteints de détresse respiratoire aigue <sup>28</sup>, cependant l'influence de l'étirement excessif sur la production de microparticules n'a pas été clairement établi. L'ensemble de ces travaux suggère donc que les forces mécaniques (cisaillement, étirement) pourraient réguler la formation des microparticules endothéliales *in vivo*.

L'objectif de mes travaux de thèse a donc été d'étudier l'effet des forces mécaniques (cisaillement, étirement cyclique) sur la génération de microparticules endothéliales *in vitro* et d'en préciser les mécanismes moléculaires impliqués (Articles I et II). Dans un deuxième temps, j'ai participé à des études portant sur la composition et l'effet biologique des microparticules sur la paroi vasculaire. En effet, si le taux de microparticules circulantes est un biomarqueur émergent du dysfonctionnement endothélial, le contenu de ces vésicules membranaires va jouer un rôle déterminant dans leurs effets biologiques. A cet égard, j'ai été amenée à étudier l'effet des contraintes de cisaillement sur la composition des microparticules, notamment en microRNA (données actuellement non publiées). J'ai aussi contribué à une étude sur le rôle proinflammatoire du transfert d'ICAM1 porté soit par les microparticules endothéliales (données actuellement non publiées) ou les microparticules de plaque d'athérosclérose (Article III) vers les cellules endothéliales.



## ***B. Méthodes Principales***

### ***B.1. Culture cellulaire***

#### **B.1.1. Culture des cellules endothéliales :**

Les cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVECs) sont mises en culture sur support en verre recouvert de gélatine, elles sont utilisées à faibles passages (1 à 3) et soumises aux différentes contraintes de cisaillement une fois à confluence.

Le choix des HUVECs a été fait car ce sont des cellules humaines, elles ont l'avantage d'être facilement cultivables tout en étant une lignée primaire non immortalisée. De plus bien qu'exprimant quelques marqueurs spécifiques des cellules endothéliales veineuses, elles expriment aussi les marqueurs classiques endothéliaux (CD31, CD144, KDR ou le facteur de von Willebrand). La veine ombilicale a pour fonction l'apport du sang oxygéné au fœtus ce qui rend le phénotype endothélial proche de celui d'une artère. Enfin, ce type cellulaire a été largement utilisé pour des expériences de contrainte de cisaillement ce qui permet d'avoir un recul quant aux observations faites. Enfin, l'utilisation de cellules à un faible passage permet d'avoir une fonction préservée de voie de la NOS endothéliale. En effet, cette fonction se dégrade rapidement avec le nombre de passage des cellules <sup>402</sup> en association avec le vieillissement et la dédifférenciation.

#### **B.1.2. Stimulation par différentes contraintes de cisaillement :**

Au laboratoire, le système utilisé est une chambre à perfusion parallèle générant un flux laminaire de différentes intensités en fonction de la vitesse de la pompe<sup>24,320</sup>. Ce système se constitue d'une chambre en plexiglas où le milieu de culture passe sur la surface des cellules (Figure 31) à laquelle est relié d'un côté (sortie) une tubule passant par une pompe péristaltique et rejoignant un réservoir. Ce réservoir est ensuite connecté à l'entrée de la chambre <sup>320</sup> (Figure 31).

Le calcul des contraintes de cisaillement se fait grâce à la loi de Poiseuille, comme pour un vaisseau, mais celle-ci est ici adaptée à une géométrie rectangulaire et non plus cylindrique :

$$\tau_w = (6\mu Q)/(Wh^2)$$

«  $\tau_w$  », la contrainte de cisaillement : définie à 0, 2 ou 20 dynes/cm<sup>2</sup> pour nos expériences.

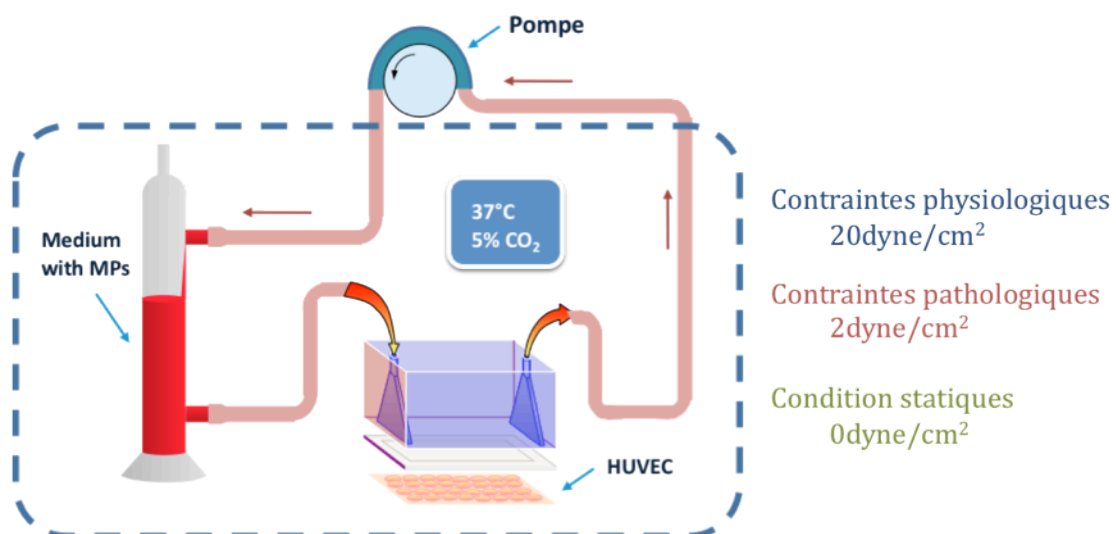
«  $\mu$  », la viscosité : égale à 0.01 poise (considérée identique à de l'eau)

«  $Q$  », le débit : c'est lui que l'on va calculer pour obtenir une viscosité donnée

«  $W$  », la largeur de la chambre : égale à 2,5cm dans notre cas

«  $h$  », l'espace entre les cellules et la partie supérieur de la chambre : 0,025cm dans notre cas.

Ainsi pour obtenir une contrainte de cisaillement de 2dynes/cm<sup>2</sup>, il faudra appliquer un débit de 0,0521 cm<sup>3</sup>/s (soit 3,125 ml/min) et pour une contrainte de cisaillement de 20dynes/cm<sup>2</sup>, il faudra appliquer un débit de 0,521 cm<sup>3</sup>/s (soit 31,25ml/min). Le circuit est placé dans un incubateur humide, 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C pendant toute la durée de l'expérience (2, 6, 12, 24 ou 48h).



**Figure 31 : Mécanisme de génération des contraintes de cisaillement.**

Les cellules endothéliales confluentes sont soumises à différentes contraintes de cisaillement grâce au réglage de la vitesse de la pompe permettant l'injection de milieu dans la cuve à débit constant.

### **B.1.3. Traitement des cellules**

Lors de ces expériences, différents inhibiteurs ou agonistes ont été utilisés pour évaluer la contribution de différentes molécules et voies de signalisation à la production de microparticules endothéliales. Les traitements utilisés sont appliqués une heure avant stimulation par les contraintes de cisaillement et pendant toute la durée de l'expérience pour maintenir l'inhibition ou l'activation des voies voulues. Les concentrations utilisées ont été définies grâce à des essais de gamme et en accord avec la bibliographie existante pour obtenir une inhibition ou activation optimale, sans effet non spécifique (Tableau 5). Les conditions contrôles ont été réalisées en présence du véhicule utilisé pour préparer ces inhibiteurs ou agonistes.

Pour certaines expériences, les cellules endothéliales ont également été transfectées pour introduire soit un siRNA soit un plasmide dans le cytoplasme. Les siRNA ont été introduits par lipofection dans le but de réprimer l'expression d'une protéine cible, ici ABCA1 (Tableau 6). La transfection de plasmide a, quant-à-elle, été réalisée par électroporation pour permettre la surexpression d'une protéine RhoA constitutivement active (mutation de la valine en position 14 par une glycine, Tableau 6).

Molécule	Cible	Concentration	Véhicule
cytochalasinD	polymérisation de l'actine	2.5x10 <sup>-4</sup> mol/L	DMSO
L-NAME	inhibiteur de NOS	10 <sup>-5</sup> mol/L	DMSO
PD98059	inhibiteur de la phosphorylation de ERK1/2	10 <sup>-5</sup> mol/L	DMSO
PDTC	inhibiteur de NFκB (dissociation / translocation noyau)	10 <sup>-5</sup> mol/L	DMSO
SB203580	inhibiteur de l'activité de p38	10 <sup>-5</sup> mol/L	DMSO
SNAP	donneur de NO	10 <sup>-5</sup> mol/L	H <sub>2</sub> O
SP600125	inhibiteur de JNK	10 <sup>-6</sup> mol/L	DMSO
T0901317	agoniste de LXR	10 <sup>-7</sup> mol/L	DMSO
Y27632	inhibiteur de ROCK	10 <sup>-6</sup> mol/L	H <sub>2</sub> O
Z-VAD-FMK	inhibiteur pan-caspases	2.10 <sup>-5</sup> mol/L	DMSO
LDL oxydés	mime les conditions pro-athérogènes	25 µg/mL	-

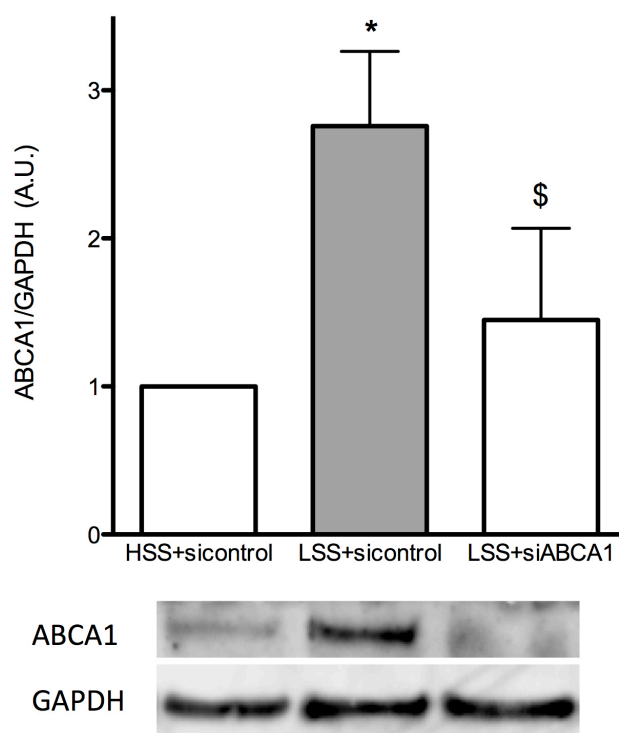
Tableau 5 : Liste des agents pharmacologiques utilisés (DMSO = diméthyl sulfoxyde)

	Concentration	Méthode	efficacité
siRNA-smart pool ABCA1	50nM	lipofection durant 6h	- 50%
siRNA-smart pool non codant		cisaillement appliqué après 24h	0%
Plasmide pSG5-RhoA-V14G	1µg pour 500000 cellules	Eletroporation en 10min cisaillement appliqué après 48h	+ 180%
Plasmide vide GFP	1µg pour 500000 cellules	vérification de la présence du plasmide GFP après 8h	+ 180%

Tableau 6 : Liste des siRNA et plasmides utilisés

Les cellules endothéliales sont un type cellulaire relativement difficile à transfecter. De plus, nous travaillons avec des cellules adhérentes sur une lame de verre de 18cm<sup>2</sup>, surface non standard pour les transfections. Des mises au point ont donc été nécessaires pour permettre une transfection optimale.

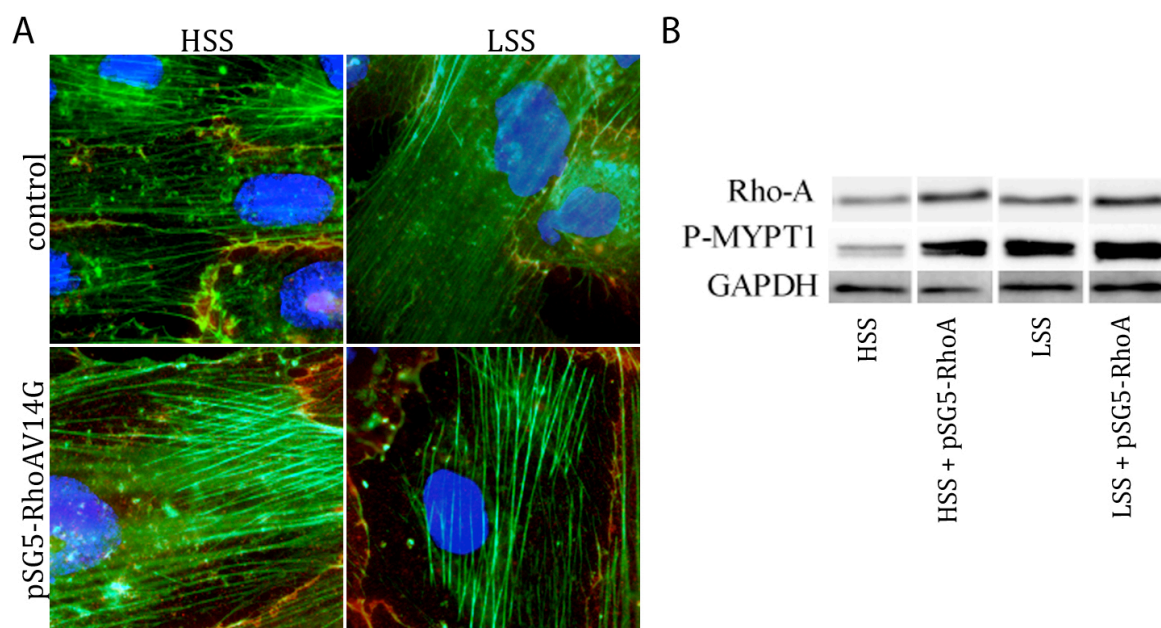
Pour la lipofection de siRNA, différents agents de lipofection ont été testés à différentes concentrations. Le milieu de transfection a été optimisé en mélangeant un milieu de culture endothélial classique (sans antibiotique et sans SVF) et un milieu spécial transfection (optimem, Gibco). La quantité de siRNA a également été adaptée pour avoir une réduction maximale de la protéine sans effet du siRNA contrôle non codant.



**Figure 32 : Efficacité de la transfection du siRNA ABCA1**

HSS : fortes contraintes de cisaillement, LSS : faibles contraintes de cisaillement. siABCA1 à 50nM, contraintes appliquées pendant 24h. test de wilcoxon, \*p<0.05 (par rapport aux fortes contraintes de cisaillement), \$p<0.05 (par rapport au faibles contraintes d cisaillement avec le siRNA control).

De même, pour l'électroporation, la quantité de réactif d'électroporation et de plasmide pour un nombre donné de cellules a été optimisée.



**Figure 33 : Efficacité de la surexpression de RhoA constitutivement active**

A. visualisation de la formation de fibre de stress intra-cellulaire (vert : actine polymérisée, rouge : CD31, bleu : noyau). B. analyse de la surexpression de RhoA et de son activité (P-MYPT1) par western blot. LSS : faibles contraintes, HSS : fortes contraintes.

Un point crucial pour la bonne réalisation de transfections (lipofection ou électroporation) avec les HUVECs est leur degré de confluence. En effet, pour une bonne intégration des liposomes et des plasmides, il est préférable que les cellules soient en train de proliférer, or il est aussi nécessaire pour nos expériences qu'elles aient atteintes la confluence avant la perte de l'efficacité du siRNA par dégradation ou la perte du plasmide par division excessive. La confluence optimale pour la lipofection a pu être défini à 75% de confluence, celle pour l'électroporation à 60%.

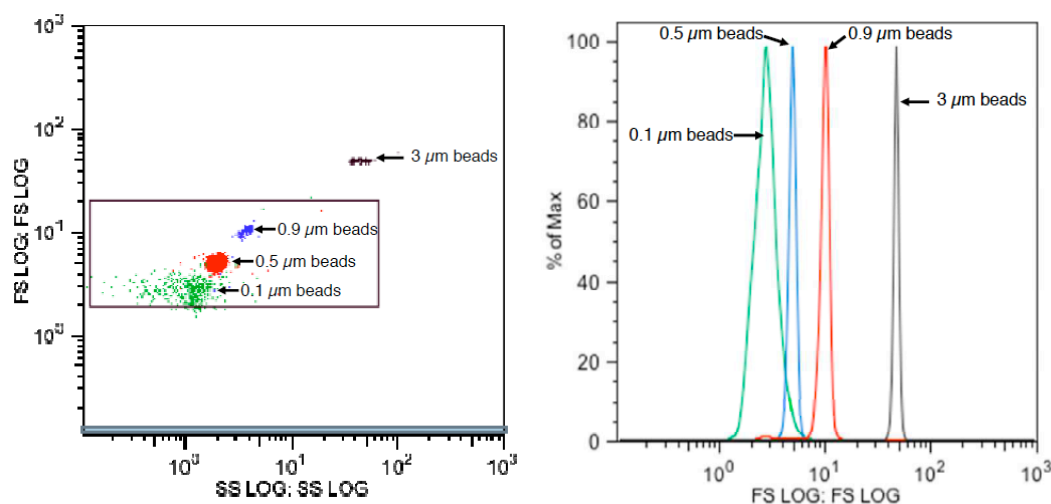
## ***B.2. Dosage des microparticules***

### **B.2.1. Isolation des microparticules :**

Les microparticules contenues dans le milieu de culture cellulaire sont isolées par centrifugations successives : une première centrifugation à 600g (+4°C) pendant 15 min permettant d'éliminer les débris cellulaires, puis le surnageant est ultracentrifugé à 20500g (+4°C) pendant 1h30 pour culotter les microparticules. Ces microparticules sont ressuspendues dans 200uL de milieu filtré 0.1  $\mu\text{m}$  pour un volume initial de 2ml, congelées à -80°C pour conservation avant analyse par cytométrie en flux.

### **B.2.2. Cytométrie en flux, définition de la zone microparticulaire :**

Les microparticules marquées ont été analysées grâce à un cytomètre en flux EPICS-XL (Beckman Coulter). La zone correspondant à la taille des microparticules (0.1 à 1um) est identifiée dans la fenêtre forward scatter (taille des évènements) et side scatter (granulosité des évènements) grâce à l'utilisation de billes de calibration (Megamix, Biocytex et billes 0.1 $\mu\text{m}$ , Invitrogen) (Figure 34).



**Figure 34 : Définition de la zone microparticulaire en cytométrie de flux.**

Sur EPIX, la zone correspondant à une taille comprise entre 0.1 et 1um a été définie grâce à différentes billes de calibration, permettant d'évaluer en forward scatter (FS log) la limite supérieure et la limite inférieure de cette zone.

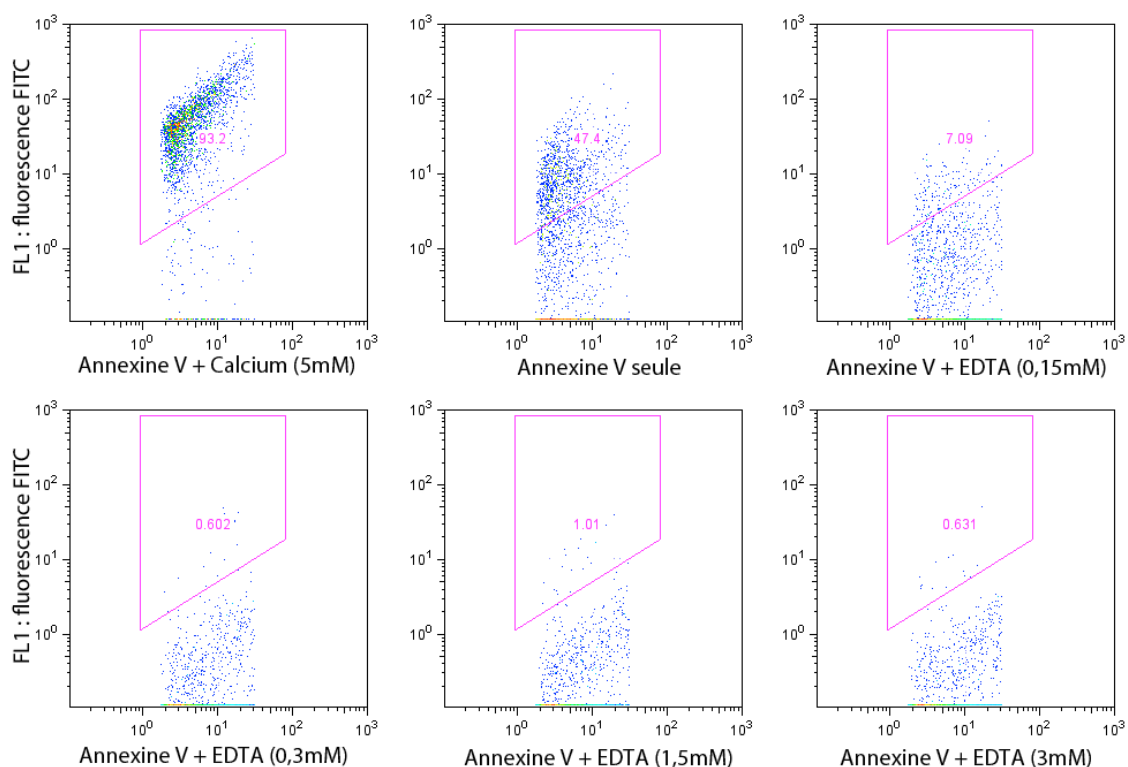
Par la suite les éléments contenus dans cette zone sont analysés en fluorescence pour évaluer le pourcentage des événements positifs pour les marqueurs utilisés. La concentration des événements de taille microparticulaire est obtenue grâce à l'ajout d'une quantité connue de billes de quantification (Flowcount, Beckman Coulter) à chaque préparation de microparticules. Les résultats sont exprimés en nombre de microparticules Annexine V+ /  $\mu$ L ou en nombre de microparticules CD144+ /  $\mu$ L.

### **B.2.3. Cytométrie en flux, marquage Annexine V :**

Les microparticules obtenues sont marquées grâce à l'Annexine V (couplé au fluoroisocyanate (FITC)) dilué dans un tampon (140 mmol/L NaCl, 10mmol/L HEPES, pH 7.4) avec calcium ( $\text{CaCl}_2$ , 5 mmol/L) pour la liaison spécifique, ou en présence d'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique, 0,3mmol/L) pour le contrôle négatif.

L'ajout d'EDTA dans le control négatif a été mis en place pour permettre une meilleure définition de la population de microparticules annexine V positive. En effet, le calcium présent dans le milieu de culture permettait une liaison partielle de l'annexine V sur les microparticules dans certaines conditions, ainsi le pourcentage d'évènements positifs était sous évalué. La concentration de calcium dans le milieu étant connue et une mole d'EDTA chélatant deux moles de calcium, la concentration d'EDTA nécessaire a été établie (0,3mmol/L finale) et une gamme autour de cette concentration a été réalisée pour s'assurer de la diminution du signal spécifique lié à la présence calcium dans le milieu (Figure 35).

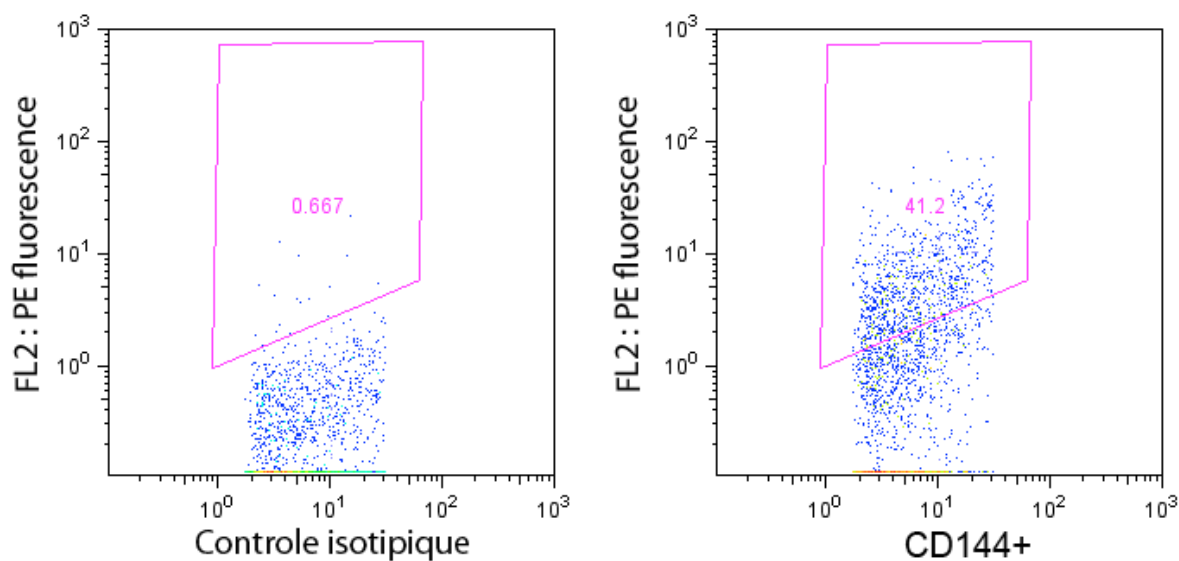




**Figure 35 : Effet de l'ajout d'EDTA sur le marquage non spécifique**

La concentration déterminée empiriquement de 0,3mM est bien la concentration optimale permettant la meilleure réduction du signal lié au calcium présent dans le milieu de culture.

Les microparticules ont également été marquées par un anticorps anti-CD144 (« vascular-endothelial cadherin ») pour confirmer les résultats majeurs obtenus *in vitro* (Figure 36) et identifier les microparticules d'origine endothéliale *in vivo*.



**Figure 36 : Marquage CD144 de microparticules générées *in vitro***

#### B.2.4. composition du culot de microparticules :

Cette isolation et cette mesure des microparticules générées *in vitro* permettent une analyse uniquement des microparticules, sans contamination par une fraction exosomale ou une fraction corps apoptotiques. En effet, j'ai montré l'absence de corps apoptotiques (double marquage Annexine V / iodure de propidium) dans la fraction microparticulaire issue de nos différentes conditions de cisaillement (Figure 37A et B). De plus, les éléments contenus dans le culot de microparticules n'expriment pas de marqueurs exosomaux (TGS101 évalué par western blot, Figure 37C) et le traitement des cellules par un inhibiteur de la formation des exosomes <sup>388</sup> (GW4869, concentration; un inhibiteur de sphingomyélinase neutre de type 2) ne diminue pas la production de microparticules, et semble même l'augmenter. L'ensemble de ces arguments montre que les méthodes d'isolation et de mesure que j'ai utilisées ne permettent pas la détection des exosomes.

##### **Figure 37 : analyse de la composition du culot microparticulaire obtenu après centrifugation**

A) Quantification des corps apoptotiques (événements AnnV+/IP+) dans la zone microparticulaire. B) Quantification des corps apoptotiques (événements AnnV+/IP+) dans la zone supérieur à 1µm. C) Expression du marqueur TGS101 dans la fraction microparticulaire sous différentes contraintes de cisaillement. D) Effet d'un inhibiteur de la production d'exosomes sur le taux de microparticules endothéliales. A, B : N=5, test de wilcoxon, \*p<0,05 (comparé au HSS), \$p<0,05 (comparé au LSS), #p<0,05 (comparé au static). C, D N=4. LSS : faibles contraintes, HSS : fortes contraintes

### ***B.3. Analyse des voies de signalisation intracellulaire***

#### **B.3.1. Analyse des protéines**

Dans le but d'identifier les protéines modulées (activité ou expression) par les différentes contraintes de cisaillement et responsables de la vésiculation endothéliale, les cellules endothéliales ont été lysées et analysées par western blot (Tableau 7).

<b>Anticorps</b>	<b>Protéine cible</b>	<b>Poids moléculaire (kD)</b>
Anti-P-ERK1/2	ERK1/2 phosphorylé en Thr202/Tyr204	42-44
Anti-ERK1/2	ERK1/2 totale	42-44
Anti-P-MLC	MLC2 phosphorylé en ser19	18
MLC	MLC2 totale	18
Anti-P-MYPT1	MYPT1 phosphorylé en Thr696	140
Anti-ABCA1	ABCA1 totale	250
Anti-Scramblase1	Scramblase1 totale	35
Anti- $\alpha$ Fodrin	$\alpha$ Fodrine totale	240
Anti-calpainD1	$\mu$ Calpaine totale	82
Anti-CalpainD4	$\mu$ Calpaine clivée	82 + formes clivées
Anti-RhoA	RhoA totale	21
Anti-GAPDH	GAPDH totale (protéine control)	37

**Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en western blot**

#### **B.3.2. Analyse de l'ARN messager**

Enfin, la régulation de l'ARN messager d'ABCA1 a été évaluée par qPCR (Tableau 8). Le traitement des cellules par du TO901317 (agoniste de LXR conduisant à l'augmentation de la transcription d'ABCA1) a permis d'avoir un contrôle positif. La spécificité des primers a été vérifiée grâce à la courbe de fusion (un seul amplicon) et à

la vérification de la taille de l'amplicon obtenu. L'Ubiquitine C a été choisie comme ARNm rapporteur pour sa stabilité d'expression dans les HUVECs <sup>399</sup>.

<b>nom</b>	<b>séquences</b>
ABCA1 forward	GAGACTAACCAGGCAATCCG
ABCA1 reverse	GCTTGTTTCAGGTTGACACACT
UbiC forward	ACATTGGTCCTGCGCTTGA
UbiC reverse	TTTTGCGAATGCAACAACCTT

**Tableau 8 : Séquences des amorces qPCR**

## ***C. Résultats***

### ***C.1. Travaux 1 : Étirement cyclique et microparticules endothéliales***

#### ARTICLE 1 : « Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism »

Dans cette première étude nous nous sommes intéressés à la contribution de l'étirement cyclique dans la production de microparticules endothéliales. Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe du Dr. Birukov à Chicago travaillant sur la régulation de la perméabilité vasculaire dans le poumon en condition physiologique et pathologique, notamment suite à une atteinte pulmonaire due à une ventilation mécanique. Dans ces conditions, l'étirement cyclique excessif est le principal responsable de l'activation pro-inflammatoire de l'endothélium et de l'augmentation de la perméabilité. Les microparticules endothéliales étant un marqueur de l'activation et de l'atteinte endothéliale dans de nombreuses pathologies, la question de l'effet de l'étirement cyclique sur la production de microparticules endothéliales se posait donc. Des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines ont été soumises à différents degrés d'étirements cycliques (0, 5, 18%) pendant différents temps (6-24h). L'étirement excessif conduit à l'activation de nombreuses voies connues pour participer à la formations de microparticules dans d'autres conditions (remodelage du cytosquelette, expression de facteurs pro-inflammatoires) et est généralement accompagné d'une inflammation locale ; c'est pourquoi différents inhibiteurs et stimuli inflammatoires ont été utilisés dans le but d'identifier les mécanismes intracellulaires mis en jeu.

Tout d'abord, nous avons pu montrer que l'étirement à un niveau pathologique induit une production de microparticules endothéliales (taux de microparticules doublé) alors que l'étirement physiologique n'induit pas une augmentation significative. Cet effet a été observé à la fois par quantification des microparticules grâce à un marquage par l'annexine V ou par le CD144.

Dans le but de mimer les conditions inflammatoires locales, les cellules ont été ensuite traitées par du LPS ou de la thrombine en association avec le stimulus

mécanique. De manière surprenante, ces deux molécules n'ont aucun effet sur la production de microparticules endothéliales, aussi bien sous étirement pathologique que physiologique.

Comme je l'ai détaillé dans l'introduction, un étirement excessif induit la formation de fibres de stress intracellulaires par activation de la voie Rho kinase, et cette activation est potentialisée par certains agonistes comme la thrombine. L'organisation du cytosquelette au niveau de la membrane étant un point important dans la formation des microparticules, l'effet d'un inhibiteur de la voie Rho kinase a été testé tout comme l'effet d'un inhibiteur de calpaïnes (protéase impliquée dans la vésiculation plaquettaire et activée par l'étirement cyclique). Aucun de ces inhibiteurs n'a d'effet sur la production de microparticules et ce, quelques soient les conditions de stimulation (statique, 5%, 18% avec ou sans thrombine). Enfin, il a été possible d'identifier un des effecteurs responsables de la production de microparticules endothéliales : les caspases. En effet, bien que l'étirement excessif ne conduise pas à une apoptose significative, l'inhibition des caspases réduit significativement le taux de microparticules endothéliales sous étirement excessif pour le ramener à un taux observé en condition physiologique.

Cette étude a donc permis d'identifier l'étirement cyclique comme un des régulateurs de la production de microparticules endothéliales. Nous avons également pu mettre en évidence que ce mécanisme est régulé par les caspases, indépendamment de l'apoptose et que malgré une activation soutenue de Rho dans nos conditions, cette protéine ne participe pas à la régulation de la production de microparticules. De nombreux points restent encore à étudier dans ce modèle, notamment l'effet de ces microparticules au niveau local, par exemple dans la régulation de la perméabilité vasculaire ou du recrutement des cellules inflammatoires, et au niveau systémique dans la transmission de signaux aux organes distants.

## **Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism**

<sup>1,2</sup>Anne Clémence Vion, <sup>3</sup>Anna A. Birukova, <sup>1,2</sup> Chantal M. Boulanger, <sup>3</sup>Konstantin G. Birukov.

<sup>1</sup>INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center – PARCC, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S970, Paris, France

<sup>3</sup>Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, Illinois, 60637, USA

**Running title:** cyclic stretch and microparticle formation

**Keywords:** pulmonary endothelium, cyclic stretch, microparticles, caspase

**Correspondence and requests for reprints** should be addressed to:

Konstantin Birukov, MD, PhD  
Lung Injury Center  
Section of Pulmonary and Critical Medicine  
Department of Medicine  
University of Chicago  
5841 S. Maryland Avenue  
MC-6026; Office N-611  
Chicago, IL 60637  
Phone: 773-834-2636  
Fax: 773-834-2687  
E-mail: kbirukov@medicine.bsd.uchicago.edu

**Supported** by the National Heart, Lung, and Blood Institutes grants HL076259, HL058064, FACCTS (University of Chicago), CODDIM doctoral fellowship for ACV.

**IN PRESS IN PULMONARY CIRCULATION**

## **Abstract**

Microparticle release by vascular endothelium has been implicated in various cardiovascular pathologies. Ventilator-induced lung injury (VILI) is a life-threatening complication of mechanical ventilation at high tidal volumes associated with excessive mechanical stretch of pulmonary vascular endothelial cells. However, a role of VILI-relevant levels of cyclic stretch in microparticle generation by vascular endothelium remains unknown. We report microparticle formation by human pulmonary endothelial cells exposed to pathologic, but not physiologic levels of mechanical stress. Stretch-induced microparticle generation was not affected by cell co-treatment with inflammatory agents thrombin or bacterial wall lipopolysaccharide. Both, the basal and pathologic cyclic stretch-induced microparticle production was not affected by Rho kinase and calpain inhibitors, but was abolished by caspase inhibitor. In contrast to lipopolysaccharide, pathologic mechanical strain did not significantly induce apoptosis in pulmonary endothelial cells. These results show for the first time that mechanical strain of pulmonary endothelial cells at levels relevant to high tidal volume mechanical ventilation is a potent activator of microparticle formation, which requires caspase activity, but this mechanism is independent of apoptosis. These results suggest a novel mechanism which may contribute to VILI-associated vascular dysfunction.



## Introduction

Ventilator induced lung injury (VILI) is a serious condition with high mortality rates and lack of effective therapeutic treatment <sup>259</sup>. VILI is triggered by excessive mechanical stimulation of lung tissue accompanied by endothelial dysfunction and increased vascular leak <sup>258</sup>. Previous studies demonstrate exacerbation of endothelial inflammatory activation and agonist-induced vascular permeability by pathologic mechanical stretch <sup>258</sup>. However, entire pathologic mechanisms induced by high magnitude cyclic stretch (CS) remain to be better characterized.

Microparticles (MP) are membrane fragments shed mainly from cell surfaces of activated, injured or apoptotic platelets, blood cells and vascular endothelium. Increased levels of circulating MP have been found in blood and vascular pathologies, as well as organ (heart, kidney) dysfunctions <sup>15,28,119</sup>. Increased MP formation by lung epithelial lining has been recently described in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome <sup>28</sup>. Increased MP levels serve as prognostic tool in a number of cardiovascular pathologies <sup>15</sup>, but MP also possess biological activities and may exacerbate existing pathological conditions by promoting inflammatory processes and stimulating intravascular blood coagulation <sup>201,287</sup>. The role of pathologic mechanical stretch in MP release by vascular endothelium remains unknown.

This study tested the hypothesis that excessive mechanical stretch associated with suboptimal mechanical ventilation may stimulate MP formation by lung vascular endothelium. We also examined combined effects of CS and agonist stimulation on MP formation and investigated the mechanisms involved in increased MP production by pathologic magnitudes of cyclic stretch.

## Materials and Methods.

*Cell culture and reagents.* Human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) and cell culture basal medium with growth supplements were obtained from Lonza (Allendale, NJ). Cells were cultured according to the manufacturer's protocol, and used at passages 5-8. Caspase inhibitor Z-VAD, Rho-kinase inhibitor Y-27632, and calpain protease inhibitor calpeptin were purchased from Bachem Bioscience (King of Prussia, PA). Unless specified, biochemical reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

*Cell culture under cyclic stretch and microparticle collection.* Cyclic stretch experiments were performed using FX-4000T Flexcell Tension Plus system (Flexcell International, McKeesport, PA) as described<sup>37,354</sup>. Experiments were performed in the presence of culture medium containing 2% fetal bovine serum pre-filtered through 0.2  $\mu$ M sterile nylon filters. HPAEC were seeded at standard densities ( $8 \times 10^5$  cells/well) onto collagen I-coated flexible bottom BioFlex plates. Both static HPAEC cultures and cells exposed to CS were seeded onto identical plates to ensure standard culture conditions. After 48 hrs of culture, each plate was gently washed with the EGM medium pre-filtered through the 0.2  $\mu$ m sterile filter, and 1.5 ml of EGM medium containing 2% FCS filtered through the 0.2  $\mu$ m sterile filter was added to each well. Experimental plates with EC monolayers were mounted onto Flexcell system and exposed to CS of desired magnitude (5% or 18% elongation) and duration (6-24 hrs). Control BioFlex plates with static EC culture were placed in the same cell culture incubator. When necessary, static controls and CS-exposed HPAEC were treated with thrombin and incubated for 6 hrs or 24 hrs of continuous exposure to both stimuli. At the end of experiment, conditioned media were collected, centrifuged (2,500 g, 10 min, +4C) to sediment cell debris; MP from clarified supernatants were further concentrated by centrifugation (20,000 g, 30 min, +4C) and used for FACS analysis.

*Characterization and quantitation of microparticles by FACS analysis.*

MPs were labelled either annexin-V coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) in calcium-dependent manner, and analyzed by flow cytometry (EPICS XL, Beckman Coulter; Brea, CA) as previously described<sup>12</sup>. For some experiments, MPs were also labeled with VE-cadherin antibody coupled to phycoerythrin (CD144-PE, Immunotech; Marseille, France) or isotypic control. Events less than 1  $\mu$ m diameter were identified in forward scatter and side scatter intensity dot representation, in comparison with fluorescent microbeads (0.5, 0.9 and 3  $\mu$ m in diameter; Megamix Biocytex; Marseille, France). MPs were defined as elements with a size less than 1  $\mu$ m and greater than 0.1  $\mu$ m that were positively labeled with FITC-Annexin V or VE-cadherin. Under the present experimental conditions, annexinV labeled over 96% of events in the microparticle gate defined as described above. Presence of apoptotic bodies was assessed as described in<sup>180</sup> by annexin-V and propidium iodine labeling of events larger than 1 micron and therefore were not included in MP quantification.

Levels of apoptotic bodies were at least 50-fold less than levels of annexin-V+ MPs in the different experimental conditions.

*TUNNEL Assay.* Endothelial cells (HPAEC) on 6-wells bioflex plates were exposed to static culture (no CS) or pathologic CS (18%) for 24 hr  $\pm$  100 $\mu$ M ZVAD or 200 ng/ml LPS. Cells were trypsinized and fixed with 2% PFA for 60 minutes at room temperature. Cells were then washed with PBS and permeabilized with 0.1% triton X for 2 minutes at 4°C. Enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and fluorescein labeled nucleotide polymers were added for 60 minutes at 37°C. Mean fluorescent intensity was then measured by flow cytometry.

*Statistical analysis.* Results are expressed as means  $\pm$  SD of three to six independent experiments. Stimulated samples were compared to controls by unpaired Student's t-test. For multiple-group comparisons, a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the post hoc Tukey test, were used.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### **Mechanical strain induces MP formation by HPAEC in an amplitude- and time-dependent manner.**

Endothelial cells were cultured at static conditions exposed to 5% CS or 18% CS for up to 24 hrs. These amplitudes recapitulate clinical scenarios of mechanical ventilation at low and high tidal volumes<sup>39</sup>. MPs released by static and CS-stimulated HPAEC were quantified as AnnexinV+ or VE-cadherin+ events. AnnexinV+MP production was significantly increased after 24 hrs of 18% CS exposure (**Figure 1A**). In turn, MP production by HPAEC exposed to 5% CS was not statistically different in comparison to static HPAEC cultures. Similar findings were obtained with VE-cadherin labeling: 18% cyclic stretch increased VE-cadherin+ microparticle production by 5-fold (from  $14 \pm 4$  to  $82 \pm 7$  CD144+EMP/ microL ; n=3). E-selectin-positive MPs were below detection levels in these experimental conditions. These findings also confirm previous reports showing that cyclic stretch does not stimulate E-selectin mRNA expression in cultured endothelial cells<sup>410</sup>.

### **Thrombin or LPS do not increase MP formation in static or CS-preconditioned HPAEC.**

Synergistic interactions between inflammatory mediators and pathologic mechanical stimulation are essential factors contributing to the two-hit model of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome<sup>142</sup>. These conditions were recapitulated in experiments with HPAEC exposed to 18% CS in the presence of inflammatory mediators thrombin or LPS.

Thrombin did not significantly affect MP production by both, static and 18% CS-stimulated HPAEC (**Figure 1B**). Stimulation of static or 18% CS-exposed cells with LPS during 6 hrs also did not cause significant activation of MP formation. Pronounced activation of MP production caused by 18% CS was not further affected by HPAEC co-treatment with LPS (**Figure 1C**). Similar findings were obtained for VE-cadherin+ MPs. Exposure to LPS did not modify the release of VE-cadherin+ MPs either under our basal conditions (control :  $14 \pm 4$  ; LPS :  $14 \pm 1$  CD144+MPs/microL ; n=3), or following exposure to 18% cyclic stretch (18% CS :  $82 \pm 7$  ; LPS+18% CS :  $68 \pm 10$  CD144+MPs/microL ; n=3). Taken altogether, these results show that

thrombin and LPS are not potent activators of MP production by HPAEC in comparison to pathologic mechanical stretch.

### **Inhibitory analysis of pathways involved in CS-induced MP production.**

Several mechanisms mediate MP production by different cell types<sup>336,363,438</sup>. Pretreatment of HPAEC with Rho kinase inhibitor Y-27632 or calpain inhibitor calpeptin did not alter CS-induced MP production, but this effect was suppressed by pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (**Figure 2A**). Similar inhibitory experiments of Z-VAD-FMK on MP production were observed in HPAEC exposed to 18% CS and thrombin, while Y-27632 was without effect on MP generation (**Figure 2B**). Z-VAD-FMK also decreased basal levels of MP production in static cells and in HPAEC exposed to 5% CS (**Figure 2C**).

To examine relation between CS-induced MP production and development of apoptosis, we evaluated apoptotic rates in static, LPS-stimulated, and CS-preconditioned HPAEC by TUNNEL assay. Effects of 18% CS on HPAEC apoptosis were negligible in comparison to apoptosis induced by LPS (**Figure 3**). Application of pathologic stretch did not further increase LPS-induced apoptosis.

## Discussion

Microparticles become increasingly recognized as indicators of tissue injury, inflammation, as well as a prognostic tool in certain pathologies. However, direct effects of mechanical stretch associated with ventilator induced lung injury on MP formation by pulmonary endothelium have not been yet explored. This study demonstrates for the first time that pathologic, but not physiologic CS is a potent activator of MP production by pulmonary endothelium.

Although various potential mechanisms of MP generation have been described, each mechanism appears to be specific to particular cell type or pathogenic stimulus. Activation of intracellular protease calpain led to rapid stimulation of MP production by platelets and involved degradation of actin-binding protein responsible for regulation of cortical actin meshwork <sup>438</sup>. In this study, inhibition of calpain activity did not affect MP production by pulmonary endothelial cells exposed to pathologic CS.

Thrombin-induced activation of RhoA GTPase and Rho kinase was shown to stimulate MP production by microvascular endothelium <sup>336</sup>. Rho signaling is also involved in pathologic responses by pulmonary EC exposed to cyclic stretch at VILI-relevant amplitude. Rho signaling is further potentiated by combination of pathologic CS and agonist stimulation <sup>39,40</sup>. Interestingly, this study demonstrates that Rho kinase mechanism was not involved in CS-induced MP production by human pulmonary macrovascular endothelium. Furthermore, addition of thrombin to 18% CS-exposed EC at a concentration sufficient to induce permeability response in static culture and enhance endothelial cell barrier disruption and Rho activity under pathologic cyclic stretch <sup>39</sup> also did not affect the MP production caused by 18% CS. These intriguing differences may be explained by cell type- or model-specific variations and potential interplay of Rho kinase with other signaling pathways involved in thrombin-induced MP production.

In contrast, CS-induced MP production was suppressed by pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK. Interestingly, Rho kinase mediated thrombin-induced MP production in microvascular EC, but was also dependent on caspase activity, while in our studies Rho kinase inhibition did not prevent CS-induced MP generation, which was mainly regulated by caspase mechanism. These data suggest that caspase activation may trigger both, Rho-dependent and Rho-independent mechanisms of

MP production, which may be dictated by cell type and specific pathologic stimulation.

Potent inhibitory effects of ZVAD may suggest apoptotic mechanism of CS-induced MP production. Furthermore, measurable levels of MPs expressing phosphatidylserine and labeling AnnexinV can be detected under the present experimental conditions and could reflect endothelial apoptosis<sup>195</sup>. However, previous studies noted modest effects of CS on apoptotic rates<sup>37,240,318</sup>, which are consistent with results of this study. Interestingly, LPS which caused pronounced endothelial cell apoptosis, showed no significant effects on MP production in our model (Figure 2D). These data strongly suggest that caspase-dependent mechanism of CS-induced MP generation by pulmonary endothelium is independent on apoptotic pathway, as it has been reported earlier for thrombin-induced endothelial MP release<sup>336</sup>. Collectively, these data support emerging role of caspase activities in non-apoptotic cellular functions<sup>10</sup> and suggest a novel non-apoptotic function for caspase signaling in CS-induced MP production.

Endothelium-derived MP have been recognized as important signal transmitters, which may act as both pro- and anti-inflammatory stimuli, exhibit prothrombotic activity<sup>272</sup> or be involved in communication between different cell types<sup>52</sup>. We might speculate that MP generated locally by the lung endothelium as result of suboptimal mechanical ventilation may transmit pathological signals distantly and thus contribute to generalized responses to mechanical ventilation known as multiple organ dysfunction syndrome. Alternatively, measuring circulating MPs could be a potential biomarker of endothelial injury in VILI. These potentially important mechanisms require further investigation to test these hypothesis.

## References

1. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(7):1027-35.
2. Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D, et al. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283(4):L678-82.
3. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(1):27-33.
4. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(8):907-16.
5. Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, Bossert FR, Ware LB. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(6):L1035-41.
6. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997;96(10):3534-41.
7. Jude B, Zawadzki C, Susen S, Corseaux D. Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98(6):667-71.
8. Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, et al. Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(4):L785-97.
9. Shikata Y, Rios A, Kawkitinarong K, DePaola N, Garcia JG, Birukov KG. Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res* 2005;304(1):40-9.
10. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, et al. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(11):3381-8.
11. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004;104(9):2761-6.

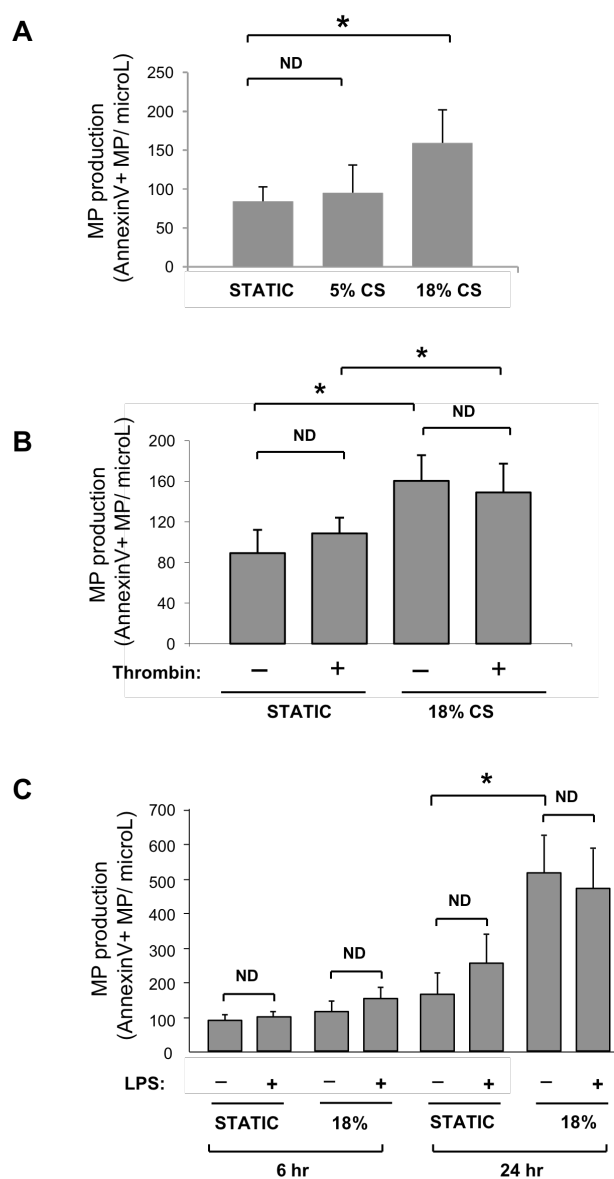


12. Birukova AA, Chatchavalvanich S, Rios A, Kawkitinarong K, Garcia JG, Birukov KG. Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol* 2006;168(5):1749-61.
13. Wagner AH, Hildebrandt A, Baumgarten S, et al. Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40 expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells. *Blood* 2011;118(13):3734-42.
14. Frank JA, Matthay MA. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 2003;7(3):233-41.
15. Sapet C, Simoncini S, Lloriod B, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 2006;108(6):1868-76.
16. Yano Y, Shiba E, Kambayashi J, et al. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb Res* 1993;71(5):385-96.
17. Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol* 2002;3:11.
18. Birukova AA, Fu P, Xing J, Yakubov B, Cokic I, Birukov KG. Mechanotransduction by GEF-H1 as a novel mechanism of ventilator-induced vascular endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(6):L837-48.
19. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;109(4):175-80.
20. Raaz U, Kuhn H, Wirtz H, Hammerschmidt S. Rapamycin reduces high-amplitude, mechanical stretch-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 2009;77(3):297-303.
21. Liu XM, Ensenat D, Wang H, Schafer AI, Durante W. Physiologic cyclic stretch inhibits apoptosis in vascular endothelium. *FEBS Lett* 2003;541(1-3):52-6.

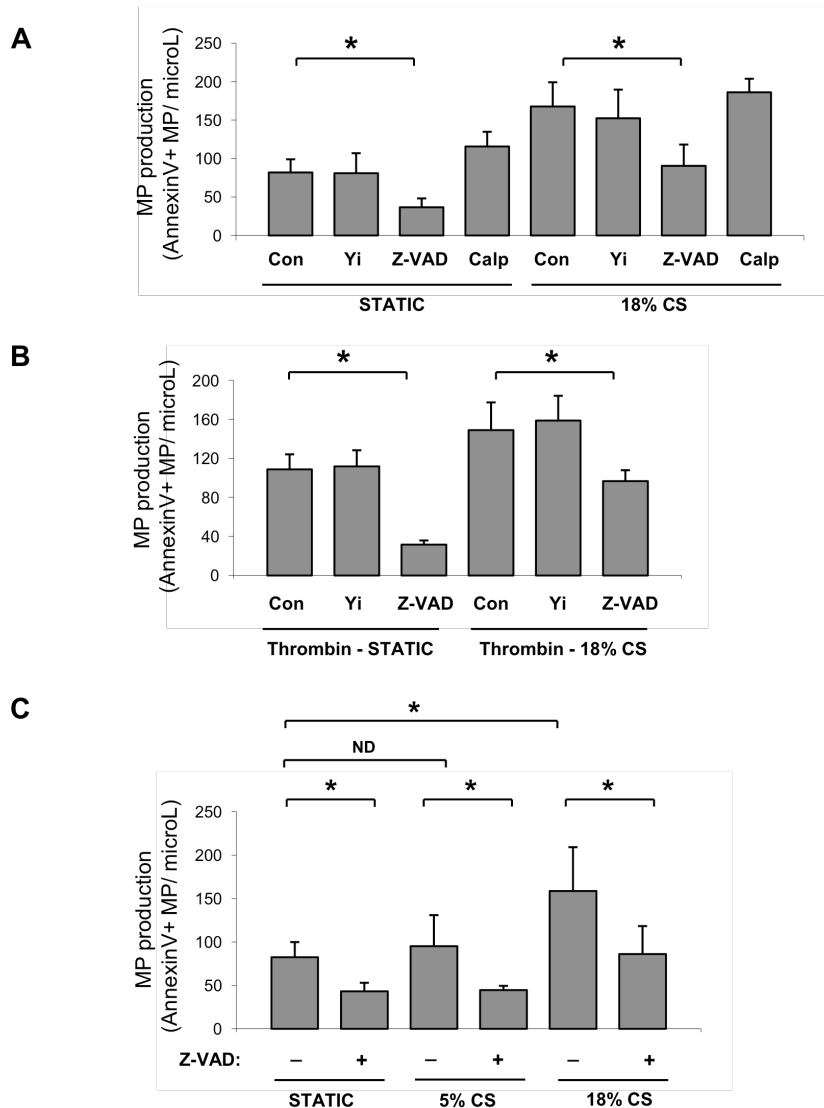
22. Algeciras-Schimnich A, Barnhart BC, Peter ME. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):721-6.
23. Morel O, Toti F, Morel N, Freyssinet JM. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* 2009;94(3):313-7.
24. Brown GT, McIntyre TM. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 $\beta$ -rich microparticles. *J Immunol* 2011;186(9):5489-96.

## Figure Legends

Vion et al., Figure 1

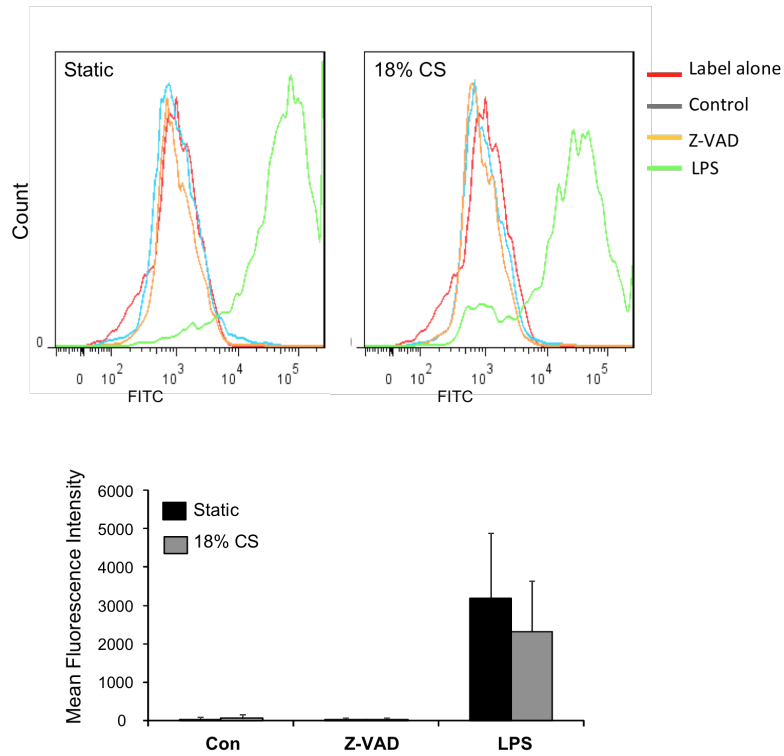


**Figure 1. Effects of cyclic stretch, thrombin and LPS on microparticle generation by human pulmonary artery endothelial cells.** HPAEC were exposed to 6 hrs (**C**) or 24 hrs (**A-C**) of CS at 5% or 18% elongation. **A** – MP formation by HPAEC exposed to 5% CS and 18% CS. **B** – HPAEC were treated with thrombin (0.3 U/ml) 10 min prior to 18% CS exposure. **D** – HPAEC were treated with vehicle or LPS (200 ng/ml) 10 min prior to CS exposure. Static cultures were used as controls. \*P<0.05.



**Figure 2. Mechanisms of CS-induced MP generation.**

**A** - HPAEC pretreated with vehicle, Y-27632 (5  $\mu$ M), Z-VAD-FMK (10  $\mu$ M), or calpeptin (100  $\mu$ M) were cultured under static conditions or exposed to 18% CS (24 hrs). **B** - HPAEC pretreated with vehicle, Y-27632 or Z-VAD-FMK in the presence of thrombin (0.3 U/ml) were cultured under static conditions or exposed to 18% CS (24 hrs). **C** - HPAEC with or without Z-VAD-FMK pretreatment were exposed to static conditions, 18% CS or 5% CS (24 hrs). **D** - HPAEC were pretreated for 30 min with Z-VAD-FMK prior to 18% CS or LPS treatment. Apoptosis was evaluated by TUNNEL assay.



**Figure 3. Effects of 18% CS on HPAEC apoptosis.**

HPAEC were pretreated for 30 min with Z-VAD-FMK (10  $\mu$ M) prior to 18% CS or LPS (200 ng/ml) stimulation for 24 hrs. Apoptosis was evaluated by TUNNEL assay.

## ***C.2. Travaux 2 : Contraintes de cisaillement et microparticules endothéliales***

### ARTICLE 2 : « Shear stress regulates endothelial microparticle release »

Cette seconde étude est l'objet principal de cette thèse. Cette fois c'est l'effet des contraintes de cisaillement sur la production de microparticules qui a été analysé. L'intérêt que nous avons porté aux contraintes de cisaillement provient de deux observations : premièrement, les faibles contraintes de cisaillement sont connues pour activer l'endothélium dans les artères de gros calibre, participant à la formation de plaques d'athérosclérose ; deuxièmement, une étude menée dans notre équipe a pu mettre en évidence une relation inverse entre taux de microparticules endothéliales circulantes et taux de cisaillement dans l'artère brachiale dans une population particulière de patients souffrants d'une dysfonction rénale terminale. Ainsi l'hypothèse selon laquelle les contraintes de cisaillement pourraient directement moduler la production de microparticules endothéliales a été émise.

La relation précédente ayant été obtenue sur un groupe de patients très particuliers, présentant une pathologie lourde, nous avons d'abord voulu confirmer qu'il existait une association entre les taux plasmatiques de microparticules endothéliales et le cisaillement basal dans un groupe de sujets asymptomatiques avec facteurs de risques cardiovasculaires. Ainsi nous avons évalué le taux de différentes sous-populations de microparticules circulantes chez 74 patients suivi en prévention primaire au Centre de Médecine Préventive Cardiovasculaire de l'HEGP. Seules les microparticules CD144 positives (microparticules endothéliales) montrent une relation inverse avec les taux de cisaillement, les microparticules leucocytaires ou plaquettaires (CD11a et CD41) ne montrant aucune relation et les microparticules érythrocytaires (CD235a) étant associées positivement avec le taux de cisaillement.

Sachant que la relation existait chez des sujet sains, l'étape suivante était d'établir une causalité entre niveau de contrainte de cisaillement et production de microparticules ainsi que d'en comprendre les mécanismes intra-cellulaires responsables. Pour cela je dispose au laboratoire d'un système de génération de flux *in vitro*. Ce système nous permet de reproduire les effets principaux des contraintes de cisaillement, un

alignement des cellules dans le sens du flux et pas d'apoptose sous fortes contraintes ; une perte de cet alignement et une augmentation de l'apoptose (sans être majeure) sous faibles contraintes. Dans un premier temps, j'ai démontré que de faibles contraintes de cisaillement conduit à une augmentation de 3 fois du taux de microparticules dans le milieu de culture par comparaison aux fortes contraintes de cisaillement. De plus, l'observation des cellules par microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence que la membrane plasmique des cellules soumises à de faibles contraintes de cisaillement présente de nombreuses déformations et bourgeonnements membranaires, contrairement à la membrane des cellules sous fortes contraintes qui apparaît très régulière.

Sachant que l'apoptose endothéliale est augmentée sous faibles contraintes de cisaillement <sup>122</sup>, notre première hypothèse a été que l'apoptose induisait la libération de microparticules endothéliales. Cependant l'inhibition de caspases ne diminue pas le taux de microparticules endothéliales sous faibles contraintes de cisaillement alors qu'en condition statique le taux est diminué de 40%. Suite à cela, je me suis intéressée à d'autres molécules connues pour être impliquées dans la production de microparticules. J'ai d'abord écarté la possibilité d'implication des calpaïnes, puisque leur activité n'est pas modulée par les contraintes de cisaillement. Je me suis ensuite intéressée à différentes protéines kinases : ROCK (« rho associated kinase »), ERK1/2, p38, JNK et au facteur de transcription NFκB. Aucun des inhibiteurs pharmacologiques visant ces différentes voies n'a eu d'effet sur la génération de microparticules en condition statique. En revanche, sous conditions pro-inflammatoires (IL-1, TNFα) j'ai retrouvé un effet de l'inhibiteur de p38 ainsi que de l'inhibiteur de NFκB déjà décrit dans la littérature <sup>96</sup>, les deux contribuant à une baisse de 50 et 40% du taux de microparticules respectivement. Au contraire, p38 et NFκB ne participent pas à la production de microparticules sous faibles contraintes de cisaillement, seuls les inhibiteurs de ERK1/2 et ROCK réduisaient le taux de microparticules. L'étude des phosphorylations de ERK1/2 et de MLC, un substrat direct de ROCK, dans ces différentes conditions a permis de mettre en avant que l'activité de ROCK et ERK1/2 est augmentée par les faibles contraintes de cisaillement en comparaison aux fortes contraintes, les deux effecteurs agissent en cascades puisque l'inhibition de ROCK abolissait la phosphorylation de ERK1/2. Enfin, j'ai montré que la production de microparticules endothéliales est augmentée dans des cellules transfectées avec un plasmide codant pour une protéine

RhoA constitutivement active (effecteur amont de ROCK) gracieusement fourni par le Dr Gervaise Loirand (Inserm UMR 1087, Nantes), confirmant ainsi l'implication de la voie RhoA-ROCK dans la production de microparticules endothéliales.

Sachant que ces effecteurs sont des régulateurs majeurs de la formation de fibres de stress, j'ai ensuite évalué le rôle de l'organisation du cytosquelette endothélial dans la production de microparticules. J'ai ainsi montré que les faibles contraintes de cisaillement induisent non seulement une augmentation des fibres de stress intracellulaires, mais aussi une délocalisation de l'actine de la membrane plasmatique, rendant celle-ci plus propice aux déformations nécessaires à la vésiculation. Cet effet est médié par l'activation de RhoA, ROCK et ERK1/2.

Une autre façon d'aborder la différence entre le taux de microparticules et contraintes de cisaillement est de se demander, non pas pourquoi les faibles contraintes de cisaillement induisent la production de microparticules, mais pourquoi les fortes contraintes sont protectrices. Un premier élément de réponse est que les mécanismes activés sous faibles contraintes de cisaillement sont réprimés. En effet, l'activation de RhoA, ROCK et ERK1/2 est moins importante dans les cellules sous fortes contraintes, favorisant ainsi la présence d'actine polymérisée à la membrane plasmatique et stabilisant cette membrane. Cependant, les fortes contraintes de cisaillement sont connues pour activer des voies spécifiques comme la production de monoxyde d'azote (NO). Mon hypothèse suivante a donc été que le NO jouerait un rôle bénéfique sur la libération des microparticules. Sous fortes contraintes de cisaillement, j'ai observé que l'inhibition de la synthétase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) induit une augmentation importante du taux de microparticules, alors que l'ajout d'un donneur de NO sous faibles contraintes de cisaillement le réduit. J'ai, de plus, montré que, dans notre modèle, l'activité de la eNOS n'influe pas sur l'activité de ROCK et de ERK1/2, mais qu'elle participe activement à la structure du cytosquelette puisque l'inhibition de la eNOS diminuait la présence d'actine à la membrane plasmatique.

Enfin, j'ai également montré que les contraintes de cisaillement régulaient l'expression de deux molécules responsables de l'externalisation de la phosphatidylserine : la scramblase-1 et ABCA1. En effet, l'expression de ces deux protéines est augmentée par les faibles contraintes de cisaillement. J'ai aussi observé que l'expression d'ABCA1 est régulée par la production de NO au niveau de son ARN messager alors que ce n'est pas le cas pour la scramblase-1. De plus, j'ai montré que



l'augmentation de l'expression d'ABCA1 sous fortes contraintes de cisaillement entraîne une augmentation du taux de microparticules et que la perte d'expression sous faibles contraintes, à l'aide d'un siARN-ABCA1, prévient la vésiculation.

L'ensemble de ce travail a donc permis d'identifier les contraintes de cisaillement comme stimuli permettant de réguler la production de microparticules endothéliales *in vivo*. Contrairement à ce que suggèrent certaines études sur les mécanismes de production de microparticules *in vitro* sous stimuli pro-inflammatoires, nous montrons ici qu'un stimulus physiopathologique (faible contrainte de cisaillement) induit la formation de microparticules indépendamment de l'apoptose et de l'activation des caspases, suggérant que le phénomène relève plus d'une activation que d'une mort cellulaire, bien que l'apoptose endothéliale soit augmentée dans les conditions de faibles cisaillements. Le remodelage du cytosquelette et l'externalisation de la phosphatidylserine sont les composantes majeures de cette vésiculation grâce à l'activité de la voie RhoA-ROCK-ERK1/2 et la surexpression d'ABCA1.

## **Shear stress regulates endothelial microparticle release**

**Running title: *endothelial microparticles and shear stress***

Anne-Clémence VION<sup>1,2</sup>, Bhama RAMKHELAWON, PhD <sup>1,2</sup>, Xavier LOYER, PhD <sup>1,2</sup>,  
Gilles CHIRONI, MD, PhD <sup>1,2,3</sup>, Cecile DEVUE<sup>1,2</sup> MSc, Gervaise LOIRAND, PhD <sup>4</sup>,  
Alain TEDGUI, PhD <sup>1,2</sup>, Stéphanie LEHOUX, PhD <sup>1,5,\*</sup>, Chantal M. BOULANGER, PhD <sup>1,2,\*</sup>

INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center PARCC, Paris, France

(1) INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center PARCC, Paris, France

(2) Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S970, Paris, France

(3) Centre de Médecine Préventive Cardiovasculaire, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

(4) INSERM UMR 1087, Institut du Thorax, Nantes, France

(5) Lady Davies Institute, Mac Gill University, Montreal, Canada

\* equally contributed to this work

### **Correspondence:**

Chantal M. Boulanger, PhD Paris - INSERM - U970 56, rue Leblanc, 75373 Paris cedex 15, France  
Tel: +331.53.98.80.86 ; [chantal.boulanger@inserm.fr](mailto:chantal.boulanger@inserm.fr)

Total word count : 6067

Key words : microparticles, shear stress, Rho-kinase, ABCA1, nitric oxide, endothelial cells

Subject codes :

**REVISION, CIRCULATION RESEARCH**

# Shear stress regulates endothelial microparticle release

**Running title:** *endothelial microparticles and shear stress*

Anne-Clémence VION<sup>1,2</sup>, Bhama RAMKHELAWON, PhD <sup>1,2</sup>, Xavier LOYER, PhD <sup>1,2</sup>,  
Gilles CHIRONI, MD, PhD <sup>1,2,3</sup>, Cecile DEVUE<sup>1,2</sup> MSc, Gervaise LOIRAND, PhD <sup>4</sup>,  
Alain TEDGUI, PhD <sup>1,2</sup>, Stéphanie LEHOUX, PhD <sup>1,5,\*</sup>, Chantal M. BOULANGER, PhD <sup>1,2,\*</sup>

INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center PARCC, Paris, France

- (1) INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center PARCC, Paris, France
- (2) Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S970, Paris, France
- (3) Centre de Médecine Préventive Cardiovasculaire, AP-HP, Hopital Européen Georges Pompidou, Paris, France
- (4) INSERM UMR 1087, Institut du Thorax, Nantes, France
- (5) Lady Davies Institute, Mac Gill University, Montreal, Canada

\* equally contributed to this work

## Correspondence:

Chantal M. Boulanger, PhD Paris - INSERM - U970 56, rue Leblanc, 75373 Paris cedex 15, France  
Tel: +331.53.98.80.86 ; [chantal.boulanger@inserm.fr](mailto:chantal.boulanger@inserm.fr)

Total word count : 6067

Key words : microparticles, shear stress, Rho-kinase, ABCA1, nitric oxide, endothelial cells

Subject codes :

**REVISION, CIRCULATION RESEARCH**

## ABSTRACT

Endothelial activation and apoptosis release membrane-shed microparticles (EMP) that emerge as important biological effectors. As laminar shear stress (SS) is a major physiological regulator of endothelial survival, we tested the hypothesis that SS regulates EMP release.

Plasma CD144+EMP levels were inversely correlated with basal shear rate in asymptomatic healthy subjects. *In vitro*, EMP levels quantified by flow cytometry in medium of endothelial cells subjected to low or high SS (2 and 20 dyne/cm<sup>2</sup>) augmented with time in low- compared to high-SS conditions. This effect was sensitive to ERK1/2 and ROCK inhibitors, but unaffected by caspases inhibitors. Low SS-stimulated EMP release was associated with increased endothelial ROCK and ERK1/2 activities and cytoskeletal reorganization. Overexpression of constitutively active RhoA stimulated EMP release under high SS. We also examined the effect of nitric oxide (NO) in mediating SS effects. L-NAME increased high SS-induced EMP levels by 3-fold, whereas the NO donor SNAP decreased it. L-NAME and SNAP did not affect ROCK and ERK1/2 activities. Then, we investigated NO effect on membrane remodelling as microparticle release is abolished in ABCA1-deficient cells. ABCA1 expression, which was greater under low SS than under high SS, was augmented by L-NAME under high SS and decreased by SNAP under low SS conditions.

Altogether, these results demonstrate that sustained atheroprone low SS stimulates EMP release through activation of ROCK and ERK1/2 pathways, whereas atheroprotective high SS limits EMP release in a NO-dependent regulation of ABCA1 expression and of cytoskeletal reorganization. These findings therefore identify endothelial SS as a physiological regulator of microparticle release.

## INTRODUCTION

Hemodynamic forces are the major determinant of atherosclerotic plaque localization. Shear stress (SS), a mechanical force generated by blood flow on the vascular endothelial cells, plays a fundamental role in regulating the phenotype of the endothelium. Plaques form preferentially at areas where blood flow is low and oscillatory such as arterial bifurcations or curvatures, whereas blood vessels exposed to high laminar shear stress are less prone to develop atherosclerotic plaques (1). The atheroprotective effect of shear stress on endothelial cells is largely explained by the local release of nitric oxide (NO), an important mediator, which reduces endothelial permeability, leukocyte adhesion and increases endothelial survival (2-4).

Microparticles (MPs) are submicron membrane vesicles (0.1 to 1  $\mu\text{m}$ ) released upon cell activation or apoptosis. They are characterized by the exposure of negatively charged phospholipids such as phosphatidylserine on their outer membrane leaflet following loss of membrane asymmetry (5). Phosphatidylserine externalization contributes to MP procoagulant potential. MPs found in human plasma originate from different cell types, mainly platelets, leukocytes and red blood cells, but also from endothelial cells (6). Endothelial microparticles (EMPs) have been identified as a marker of endothelial dysfunction and as a marker of systemic vascular remodelling (7). So far, the pathophysiological mechanisms regulating EMP formation *in vivo* remain unknown. *In vitro*, endothelial apoptosis and activation by pro-inflammatory mediators increase EMP basal release by activating either caspase-, Rho-kinase- or MAPkinase-dependent pathways (7). Since low shear stress is an important determinant of endothelial apoptosis *in vivo*, we hypothesized that different shear stress levels might regulate *in vivo* endothelial vesiculation (8). The aim of this study was therefore to evaluate the effects of shear stress on EMP release.

We first investigated whether or not EMP plasma levels associate with arterial shear rate, the major determinant of shear stress, in healthy subjects presenting at least one cardiovascular risk factor. We previously observed in patients with end-stage renal failure that EMP plasma levels are inversely correlated with local arterial shear stress (9). This relationship was independent of age and blood pressure, but this observation was made in a group of highly selected patients. We also examined the effects of different shear stress profiles on EMP release *in vitro* conditions and investigated the signalling pathways involved.

## **Materials and Methods**

(see online data supplement for expanded version)

### **Clinical study**

Eighty-one asymptomatic subjects without known cardiovascular disease from the MiPRA-Met cohort (10) (11) were included and their cardiovascular risk factors were assessed according to current guidelines (12, 13). The risk of coronary heart disease was estimated by entering age, male sex, systolic pressure, total and HDL-cholesterol, presence or absence of smoking into the Framingham model equations (13) and defined the 10-year coronary risk as low (<10%), intermediate (10-20%) or high (>20%). The study was approved by the local ethical committee, and all participants gave written informed consent.

Subjects were examined after 12 h fasting in the supine position. The brachial artery was visualized longitudinally by high-resolution ultrasound (ATL 5000) with a 7–12 MHz transducer probe positioned above the elbow and fixed in a robotic arm. Resting wall shear rate was calculated as four times the ratio between the pulsed Doppler-measured mean blood velocity and the diastolic diameter. A study of repeatability in 20 subjects previously showed that two manoeuvres of shear rate measurement performed 10 min apart were highly correlated ( $r=0.82$ ,  $p<0.001$ ) with a coefficient of variation of 12% (14).

Platelet-free plasma was obtained from citrated blood after centrifugation at 1500g (15min) followed by 11 000g (2 min) within one hour after blood withdrawal, as described earlier (15).

### **Cell culture**

Confluent human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVEC; passage 2 to 4; Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured on 0.2% gelatin-coated slides (Menzel Glazer; Braunschweig, Germany) in endothelium cell basal medium containing growth factors, 1% foetal calf serum (Promocell), streptomycin (100u/ml), penicillin (100u/ml) and Amphotericin B (10 $\mu$ g/L).

### ***SiRNA transfection***

SiRNA targeting ABCA1 mRNA was used to transiently suppress ABCA1 protein expression and non-targeting siRNA was used as control (both from Dharmacon, ON-target plus smart pool siRNA). siRNA was transfected to endothelial cells by lipofection using hyperfect. Briefly, siRNA and hyperfect were resuspended separately in medium without antibiotics (Optimem, Gibco), when mixed together in order to obtain liposomes containing siRNA and added onto the cells. After 6 hours, medium was change for endothelium cell basal medium and shear stress experiments were performed 18 hours later.

### ***Plasmid electroporation***

DNA vector corresponding to pSG5-RhoA-V14G was used to transiently express the constitutively active V14-RhoA mutant (16). Nucleofector (Lonza/Amaza) was used to transfect cDNA according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiency was assessed by RhoA and Phospho-MYPT1 (RhoA target substrate) western blot.

### ***Microparticle generation, isolation and characterization***

A unidirectional laminar shear stress (SS) was applied to confluent HUVECs using a parallel plate chamber system as described earlier (17). The medium (0.1  $\mu\text{m}$  filtered) was perfused at different rates and for different times (2-24 h). Local shear stress was calculated using Poiseuille's law and averaged 0, 2 or 20 dynes/cm<sup>2</sup>, corresponding to static, low and high shear stress conditions, respectively.

Cells were treated with either the nitric oxide (NO) synthase inhibitor N-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME, 10<sup>-5</sup> mol/L), the NO donor *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP, 10<sup>-5</sup> mol/L), the ERK1/2 inhibitor PD98059 (10<sup>-5</sup> mol/L), the Jun-kinase inhibitor SP600125 (10<sup>-6</sup> mol/L), the p38 pathways inhibitor SB203580 (10<sup>-5</sup> mol/L), the Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor Y27632 (10<sup>-6</sup> mol/L), the NF $\kappa$ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 10<sup>-5</sup> mol/L), cytochalasin D inhibitor of actin polymerization (cytoD, 2.5x10<sup>-4</sup> mol/L), the LXR agonist TO901317 (10<sup>-7</sup> mol/L) (all from Sigma Aldrich; St Louis, MO), or the general caspase inhibitor Z-VAD-FMK (2.10<sup>-5</sup> mol/L) (R&D systems; Minneapolis, MN). EMPs were also released following TNF $\alpha$  exposure (10<sup>-5</sup> g/L, Calbiochem; Darmstadt, Germany). All inhibitors were added to the cells 1h prior to TNF $\alpha$ - or shear stress exposure and were kept during the indicated experimental times. The perfusion medium was collected, centrifuged to eliminate any cell debris (600g, 15 min; 4°C) and the resulting supernatant was then ultra-centrifugated (90 min; 20500 g; 4°C) to pellet the MP fraction, which was resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of 0.1 $\mu\text{m}$  filtered medium and stored at -80°C.

Microparticle pellets were analyzed for the presence of apoptotic bodies and exosomes. Levels of apoptotic bodies were estimated as AnnexinV+ Propidium iodide+ vesicles in the 1-4 $\mu\text{m}$  range according to Hristov et al (18). AnnV+IP+ apoptotic bodies averaged 11 $\pm$ 1.8, 13 $\pm$ 1.7 and 14 $\pm$ 4.6 events/ $\mu\text{L}$  in HSS, LSS and static conditions, respectively (n=5), and were therefore negligible in each experimental condition. In addition, the presence of exosomes was estimated using the specific marker TSG101 (19). TSG101 levels were hardly detectable in endothelial MP preparations when compared to a positive control (exosome fraction from human plasma, pelleted following centrifugation at 100000g for 4 hours) (**supplemental figure 1**).

### **Microscopy**

HUVECs were observed by contrast phase microscopy after each SS experiment to confirm correct response to SS using Zeiss Primo Vers (magnitude: 10x5). Transmission electron microscopy was performed at the IFR83-Jussieu-PARIS core facility.

*In situ* cell death detection kit from ROCHE (Neuilly-sur-seine, Fr) was used to stain apoptotic cells and quantify the number of green fluorescent nuclei on DAPI-blue stained cell nuclei. Actin localization at the plasma membrane was assessed by co-staining using fluorescent phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA) and anti-CD31 antibody (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ). Actin localization at the plasma membrane was quantified by a score system for each image (0: no colocalization to 3: full colocalization) by three different blinded operators.

### **Flow cytometry analysis**

MPs were labelled either with annexin-V coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) in calcium-dependent manner, or with VE-cadherin antibody coupled to phycoerythrin (CD144-PE, Immunotech; Marseille, Fr) or isotopic control. MPs were analyzed by flow cytometry (EPICS XL, Beckman Coulter; Brea, CA) as previously described (15). Events less than 1µm diameter were identified in forward scatter and side scatter intensity dot representation, in comparison with fluorescent microbeads (0.5, 0.9 and 3 µm in diameter; Megamix Biocytex; Marseille, Fr). MPs were defined as elements with a size less than 1 µm and greater than 0.1 µm that were positively labeled with either FITC-Annexin V or CD144-PE antibody.

### **RNA Extraction and Real-Time quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction**

RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). RT-PCR was performed with 0.1µg of RNA (Qiagen); qPCR was performed using SYBRgreen (Sigma). Primer sequences were as follows: ABCA1 sense, GAGACTAACCAGGCAATCCG, ABCA1 antisense, GCTTGTTTCAGGTTGACACACT; Ubiquitin C sense, ACATTGGTCCTGCGCTTGA, Ubiquitin C antisense, TTTTGCGAATGCAACAACCTTT (obtained from Eurogentec), used at final concentration of  $3.3 \times 10^{-7}$  mol/L. Ubiquitin C was used as housekeeping gene as previously described (20) to normalize the expression of ABCA1. Normalization was done using the 2deltaCT method.

### **Western blotting**

HUVECs were scraped off in RIPA or NETF buffer (100mmol/L NaCl, 50mM TrisHCl pH7.4, 2 mmol/L EDTA, 50mmol/L NaF, 1% NP-40, complete protease inhibitor cocktail tablet and complete phosphatase inhibitor cocktail tablet). Microparticules pellet were resuspended in RIPA after centrifugation. Nitrocellulose membranes were incubated with anti-α-fodrin (Enzo life sciences, Plymouth Meeting, PA, 1:1000), anti-μ-calpain (recognizing D1 (latent form) and D4 domain (latent + aminoprocessed forms), Abcam, Cambridge, UK, 1:1000), anti-phospho-ERK1/2, anti-Phospho-MYPT1 (Santa Cruz, CA; 1:1000), anti-phospho-MLC, anti-ERK1/2, anti-MLC (Cell Signaling Technology; Beverly, MA; 1:1000), anti-scramblase-1 (Acris, San Diego, CA, 1:100), anti-ABCA1



(Millipore, 1:1000), anti-TGS101 (Abcam, 1:1000) antibodies or with anti-Phospho-MYPT1 antibody (Santa Cruz, CA; 1:500). After secondary antibody incubation, immunodetection was performed using an enhanced chemiluminescence kit (Immun-Star Western C kit, Bio-Rad) and bands were revealed using the Las-4000 imaging system and Image Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan). Membranes were re-probed with anti-GAPDH antibody (Chemicon, Millipore; Billerica, MA, 1:8000) for cell lysate or stained with ponceau-red for microparticles samples.

## **Statistical analysis**

**Clinical study:** Clinical continuous parameters are expressed as means  $\pm$  standard deviations with ranges and qualitative parameters as number of subjects (%). Quantitative variables with non normal distribution (CD144+ or CD11a+ microparticles) were log-transformed to achieve normal distribution before correlations analysis. Normal distribution was assessed by means of the Shapiro-Wilk test. The relationship between MP levels and brachial artery baseline shear rate was analysed by linear regression, both in univariate analysis and in multivariable analysis by adjusting for each of the risk factors (one by one), with MP as the dependent variable, and with shear rate and each risk factors as the independent variables.

**In vitro study:** Data obtained from at least 5 independent experiments are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistics were performed using Prims software. Comparisons between different shear stress conditions or between control and treatment conditions were performed using a Wilcoxon signed-rank test (paired and non-parametric T-test). For ABCA1 mRNA expression only, controls were not paired with treatment, so a Mann-Whitney U-test was used. Significance was accepted for a value of  $p < 0.05$ .

## Results

### Atheroprone-low laminar shear stress augments endothelial MP shedding

Circulating EMPs were quantified as CD144-positive events in platelet-free plasma obtained from 74 asymptomatic subjects. As shown in **Table 1**, 93% of the patients were at low to intermediate 10-year coronary risk. CD144+ MPs and brachial artery baseline shear rate did not differ between men and women. In univariate analysis, CD144+ MP plasma levels were inversely related to brachial artery baseline shear rate ( $r=-0.25$ ,  $p=0.0245$ ), which is directly proportional to SS assuming that blood viscosity does not significantly vary in healthy subjects (**Figure 1A**). This inverse relationship remained significant in multivariable analyses after adjusting for: (i) either age, male gender, hypertension, hypercholesterolemia, low HDL, smoking or diabetes; (ii) the integration of multiple risk factors as expressed by the number of cardiovascular risk factors or by the 10-year Framingham risk score ( $p<0.05$ ). However, no significant correlation was observed between brachial artery baseline shear rate and CD11a+ ( $r=0.041$ ,  $p=0.084$ ) leukocyte MP levels, which are associated with subclinical atherosclerosis (10). In view of this observation in healthy subjects, *in vitro* experiments on cultured endothelial cells were designed to evaluate the effect of different levels of shear stress on the subsequent EMP release.

Low-passage endothelial cells were maintained for up to 24 h under sustained atheroprotective high laminar SS (20 dyn/cm<sup>2</sup>), atheroprone low laminar SS (2 dyn/cm<sup>2</sup>) or static conditions. EMP levels were quantified in culture medium after up to 24hr exposure to the different SS levels. After 12hr, both low SS and static conditions significantly augmented EMP release when compared to atheroprotective high SS profile, reaching a 2.5- and 3-fold increase at 24hr, respectively ( $p<0.001$ ) (**Figure 1B**). This finding was confirmed when labeling EMPs with an anti-VE-cadherin (CD144) antibody (**Figure 1C**). Electron microscopy investigations demonstrated that endothelial membrane blebs were formed under static condition, and even more under low SS, whereas plasma membrane of cells exposed to high SS appeared more regular (**Figure 1D**). As expected, cells were aligned under high SS but not under low SS or static conditions (**supplemental Figure 2A**). Furthermore, apoptosis evidenced by TUNEL staining was more pronounced under low SS or static conditions than under high shear stress (**supplemental Figure 2B**).

Then, we tested the hypothesis that EMP release results from increased endothelial apoptosis in low SS and static conditions. The pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK abolished endothelial apoptosis in both conditions ( $p=0.05$ , **supplemental Figure 2B and C**), significantly decreased the release of EMP under static condition ( $p=0.0078$ , **Figure 2A**), but had no effect under low SS condition ( $p=0.8125$ ; **Figure 2A**). These results demonstrate that endothelial caspase activity does not contribute to low SS-associated EMP release.

### **Pathways implicated in EMP release under low shear stress.**

Next, we examined the potential contribution of Rho-Kinases (ROCKs), MAP-kinases and NFkB pathways, as previous studies identified the role of these pathways in EMP release under proinflammatory conditions (21), (22). None of the five inhibitors tested affected the basal EMP release in the absence of TNF $\alpha$  (static conditions) (**Supplemental Table 1**). In agreement with previous reports, NFkB and p38-MAP kinase pathways inhibitors abolished TNF $\alpha$ -induced EMP release, whereas ROCK, ERK1/2 and Jun-kinases inhibitors had no effect (15, 22) (**Supplement Table 1**). However, unlike what was observed for TNF $\alpha$ -induced stimulation, inhibitors of ROCK (Y27632) and ERK1/2 (PD98059) significantly decreased the release of EMP upon exposure to low SS ( $p < 0.05$  both), whereas inhibitors of p38 MAP-kinase, Jun-kinase and NFkB were without effect (**Figure 2B**). Concomitant inhibition of ROCK and caspases using Y27632 and Z-VAD-FMK showed no additional effect when compared to experiments in the presence of ROCK inhibitor alone ( $41 \pm 17$  vs.  $42 \pm 3$  % inhibition; respectively,  $N=4$ ). Exposure to low SS for 12h significantly increased phospho-MLC (a ROCK substrate) and phospho-ERK1/2, when compared to high SS (**Figure 3A**), showing that a sustained exposure to low SS increased endothelial ROCK and ERK1/2 activities, whereas no difference was observed between cells exposed to high SS and those maintained under static conditions ( $p=0.90$  and  $0.55$ , respectively). The ROCK inhibitor Y27632 significantly decreased phospho-MLC ( $p=0.045$ ) and phospho-ERK1/2 ( $p=0.034$ ) levels in low SS exposed endothelial cells, whereas the ERK1/2 inhibitor PD98059 only reduced the level of phospho-ERK1/2 ( $p=0.01$ ) without affecting that of phospho-MLC ( $p=0.43$ ) (**Figure 3B**). Finally, the ROCK inhibitor Y27632 did not affect EMP release upon high SS (24 h; control:  $123 \pm 33$ ; Y27632:  $112 \pm 43$  AnnV+MPs/ $\mu$ L;  $N=4$ ,  $p=0.95$ ). Conversely, increasing ROCK activity by endothelial cell transfection with the constitutively active RhoA-V14 mutant increased EMP release under high SS, when compared to mock-transfected cells (**Figure 3C**).

Actin depolymerization at the plasma membrane is a key factor in circulating MPs formation (23, 24). Exposure of endothelial cells to cytochalasin D under static condition reduced intracellular actin stress fiber formation, augmented actin localization at the plasma membrane, and decreased EMP release ( $p=0.05$ , **Figure 4A**). Fewer amounts of F-actin were localized at the plasma membrane under low SS, when compared to high SS conditions ( $p=0.032$ , **Figure 4B**). To demonstrate that activation of the ROCK and ERK1/2 pathways was associated with F-actin delocalization from the plasma membrane, we evaluated the level of F-actin at the plasma membrane following inhibition of ROCK and ERK1/2. Both inhibitors restored F-actin localization at the plasma membrane in endothelial cells chronically exposed to low SS (ROCK inhibition:  $p=0.043$ , ERK1/2 inhibition:  $p=0.049$ ), whereas they had no effect under high SS condition (**Figure 4B**). As expected, transfection with the constitutively active RhoA-V14 mutant increases stress fiber in endothelial cytoplasm both under HSS and LSS conditions (**figure 4C**). When we examined the plasma membrane, RhoA overexpression

clearly decreased the level of polymerized actin, confirming that LSS induced EMP release is mediated by membrane weakening (**figure 4C**).

As  $\mu$ -calpain activation mediates platelet MP shedding, we also examined its potential contribution to increased EMP release under low SS. Cleavage of  $\alpha$ -fodrin (150 kD fragment vs 250 kD) and expression of total  $\mu$ -calpain (D4) and cleaved  $\mu$ -calpain (D1) were monitored upon different SS profiles as an index of endothelial calpain activity (25). The expression of latent  $\mu$ -calpain, its cleavage and the cleavage of endothelial  $\alpha$ -fodrin were not different between high SS, low SS and static exposure (**supplemental Figure 3A and B**), demonstrating that  $\mu$ -calpain activity is not associated with the increased in EMP release under low SS.

### **Effect of nitric oxide on endothelial MP release upon different shear stress profiles**

As nitric oxide (NO) is an important mediator in the response of endothelial cells to different SS profiles, we tested the hypothesis that endogenous NO might affect the release of EMPs under these conditions. Exposure to L-NAME significantly increased EMP release under atheroprotective high SS, whereas it was without effect in atheroprone low SS conditions (**Figure 5A**). Similarly, exposure to the NO donor SNAP during sustained exposure of endothelial cells to low SS significantly decreased the release of EMPs from  $442 \pm 36$  to  $271 \pm 27$  AnnV+ MPs/ $\mu$ L (N=6;  $p=0.031$ ). These results therefore show that SS-induced NO production prevents EMP formation. To evaluate a possible effect of L-NAME on caspase activation, endothelial cells were treated with both L-NAME and Z-VAD-FMK under high SS. No significant effect was observed on EMP levels (HSS+L-NAME:  $378 \pm 44$ , HSS+L-NAME+Z-VAD-FMK:  $288 \pm 67$  AnnV+EMPs/ $\mu$ L,  $p=0.56$ , N=6), therefore ruling out the possible contribution of caspase activation to EMP release following NOS inhibition.

Then, we tested the possible repressive effect of NO on the ROCK-ERK1/2 pathway. Western blot analysis demonstrated that neither L-NAME (**supplemental Figure 4A**) nor SNAP (data not shown) affected the levels of phospho-MLC and phospho-ERK1/2. Co-treatment with SNAP and the ERK1/2 inhibitor reduces EMP release compared to ERK1/2 inhibition alone, but had no significant effect when compared to SNAP alone ( $p=0.031$  and  $0.18$  respectively; N=6, data not shown). These observations suggest that NO and ERK1/2 have common effectors regarding endothelial MP release. To demonstrate that NO prevents F-actin delocalization from the plasma membrane, we evaluated the level of F-actin at the plasma membrane following NOS inhibition. L-NAME treatment decreased F-actin localization at the plasma membrane in endothelial cells chronically exposed to high SS ( $p=0.031$ ), whereas this inhibitor had no effect under low SS condition (**Figure 5B**).

Then, we focused on plasma membrane remodeling and phosphatidylserine externalization as the other key factor in MP release and investigated the contribution of scramblase-1 and ABCA1 flippase to NO effects. Scramblase-1 expression was increased under low SS condition as compared to high SS ( $p=0.047$ ), but was not affected by L-NAME (**supplemental Figure 5**). Sustained exposure to

low SS also significantly increased endothelial ABCA1 expression, when compared to high SS ( $p=0.047$ , **Figure 6**). Exposure to L-NAME augmented ABCA1 protein expression under high SS, to reach a value not different from that of cells exposed to low SS ( $p=0.87$ ; **Figure 6A**). qPCR analysis of ABCA1 mRNA expression demonstrated that low SS increased ABCA1 mRNA levels compared to high SS, and NOS inhibition increased ABCA1 mRNA levels under both low SS and high SS conditions (**Figure 6B**). SNAP addition reduced mRNA expression under low SS ( $N=5$ ,  $p=0.031$ ; data not shown). When endothelial cells were exposed to the LXR agonist TO901317 ( $10^{-7}$  mol/L), ABCA1 mRNA expression increased by 18-fold ( $N=3$ , data not shown) and EMP release augmented by 1.4-fold under high shear stress condition ( $N=5$ , **Figure 7A**). We also silenced ABCA1 under the different shear profiles to further confirm the contribution of ABCA1 to EMP release. Transfection efficacy averaged 55% and ABCA1 expression levels in low SS conditions were no longer different from those observed under high SS ( $p=0.81$ ;  $N=7$ ; **Figure 7B**). Under these experimental conditions, ABCA1 silencing significantly reduced EMP release by 40% under low SS ( $p=0.015$ ; **figure 7C**). Finally, expression of ABCA1 nor scramblase1 were not affected by ROCK inhibition under low shear stress ( $p=0.43$  and  $p=0.68$ , respectively; **supplemental Figure 6**).

## DISCUSSION

The present results demonstrate for the first time that atheroprone SS conditions stimulate the formation and release of EMPs and identify hemodynamic forces as an important determinant of their plasma levels in healthy subjects.

In this study, we quantified EMPs in endothelial cell supernatant using either calcium-dependent AnnexinV-labeling or CD144 antibody (vs. isotype). Under static conditions, lower amounts of CD144+EMPs were detected when compared to AnnexinV+EMP levels, possibly because expression levels of CD144 might be below detection levels for some EMPs whereas more than 90% of submicron events present in the cell supernatant labeled with AnnexinV in a calcium-dependent manner in stimulated conditions.

Endothelial cells in culture shed membrane microparticles in response to apoptotic stimuli (such as serum deprivation or exposure to camptothecin (26)) or following activation by TNF $\alpha$ , thrombin, PAI-1, angiotensin II, reactive oxygen species, uremic toxins or oxidized LDLs (7, 21, 22, 27-30). Because SS is a major determinant of endothelial survival (31), we tested the hypothesis that low SS augments the EMP release *in vitro*. Sustained exposure to atheroprone low SS conditions increased both endothelial apoptosis and the release of microparticles in the medium, when compared to physiological high SS conditions. EMP release was already detectable at 12 h and further increased after a 24h exposure to low SS. Interestingly, a pan-caspase inhibitor decreased endothelial apoptosis but did not modify EMP release, demonstrating that caspase activation was not involved in low SS-induced microparticle formation.

Previous studies have reported activation of different signaling pathways during EMP release depending on the agonist triggering membrane vesiculation. EMP formation requires activation of the RhoA-ROCK pathway during thrombin and angiotensin II stimulation (21), (29), whereas TNF $\alpha$ -dependent EMP release is controlled by the p38-MAP kinase pathway (22). We observed in the present study that low SS-induced EMP release was decreased by ROCK and ERK1/2 inhibitors, whereas inhibitors of p38-MAP kinase, NF $\kappa$ B and Jun-kinase pathways were without effect. The contribution of the ROCK pathway was supported by the observation that the ROCK activity was stimulated after a 12h exposure to low SS, as evidenced by increases in MLC phosphorylation. Interestingly, the modest EMP release observed upon sustained high SS conditions was insensitive to inhibition of Rho-kinase activity. Furthermore, increased ROCK activity following constitutively active RhoA over-expression in endothelial cells exposed to high SS stimulated EMP release by about 2-fold, to reach levels comparable to those observed upon low SS condition. Taken altogether, these findings identify the ROCK pathway as a major determinant of EMP release upon sustained exposure to atheroprone low SS (**Figure 8**). Sustained low SS activation of the ROCK pathway increased ERK1/2 activity as the preferential ROCK inhibitor Y27632 impaired ERK1/2 phosphorylation, leading to cytoskeletal reorganization and subsequent EMP release.

Our findings also demonstrate that endogenous NO release from endothelial cells chronically exposed to atheroprotective high SS prevented the release of EMPs. The NO-synthase inhibitor L-NAME increased EMP release under high SS, whereas the NO donor decreased EMP release under low SS. Part of this effect might result from an increased presence of polymerized actin in the vicinity of the plasma membrane. Down-regulation of ABCA1 expression by endogenously released NO could explain -at least in part- the abrogated release of EMPs in HUVECs exposed to high SS (**Figure 8**). Deletion of the ABCA1 locus in mice is an experimental model for the human Tangier dyslipidemia, a naturally occurring loss of function mutation in man characterized by low or undetectable plasma levels of high-density lipoprotein (HDL) and increased deposition of cholesteryl esters in tissues (32, 33). The control of cellular lipid effluxes by ABCA1 is a consequence of the intrinsic flippase activity of the ABCA1 transporter that modulates the distribution of phosphatidylserine at the plasma membrane (32), (5, 34). Indeed, cells from ABCA1 deficient mice expose lower amounts of phosphatidylserine and release fewer MPs (32), (35), (36). Our finding of increased EMP release following endothelial cell stimulation with a potent LXR activator, which increases ABCA1 expression (37), reinforces the role of ABCA1 flippase in regulating EMP release in a NO-dependent manner. Although the present results identify for the first time a NO-dependent regulation of ABCA1-mediated release of EMPs, they do not exclude the possibility that other regulators of membrane remodeling and phosphatidylserine exposure might be affected by endothelial NO. However, the present data rule out a NO-dependent regulation of scramblase-1 expression in endothelial cells: like ABCA1, scramblase-1 expression was decreased under high SS, but unlike ABCA1, its expression was not restored by L-NAME.

Our *in vitro* findings are corroborated by the negative association we observed specifically between plasma EMP levels and arterial shear forces in apparently healthy subjects, independently of traditional risk factors. We previously made a similar observation in patients with end-stage renal diseases (9), who are known for having endothelial dysfunction. Taken together, our findings demonstrate that physiological atheroprotective high SS hampers EMP release by limiting phosphatidylserine exposure resulting from endogenous NO release and subsequent down-regulation of ABCA1 expression (**Figure 8**). However, under pathological conditions (i.e. sustained atheroprone low SS), endothelial ROCK activity is augmented and the cytoskeleton is reorganized. Concurrently, endothelial NO synthase expression is decreased (38), resulting in the loss of the nitric oxide-mediated repression of ABCA1, leading to membrane remodeling and phosphatidylserine exposure. Both increased Rho-kinase activity and ABCA1 expression concur to increase EMP release under low shear stress pathological conditions.

In conclusion, this study identifies for the first time shear stress as a major determinant of endothelial microparticle formation and release, both *in vitro* and *in vivo*.

**Acknowledgements:** We acknowledge Pierre-Emmanuel Rautou and José Vilar for helpful discussions, Alain Grodet and Cyrielle Sophie for electron microscopic analysis and Lamia Ouchiha and Thibaut Poncin for western blot and fluorescent microscopy analysis.

**Source of funding:** this research was supported by INSERM, University Descartes Paris 5, ANR-05-Physio “MiPraMet”, and by ANR-2010-EmiRisk. ACV is supported by a fellowship from the Region Ile-de-France (CDDIM) and XL by a fellowship from the Fondation Lefoulon Delalande. CMB is a recipient from a Contrat d’Interface Hospitalier APHP Cochin.

**Conflict of interest:** none.



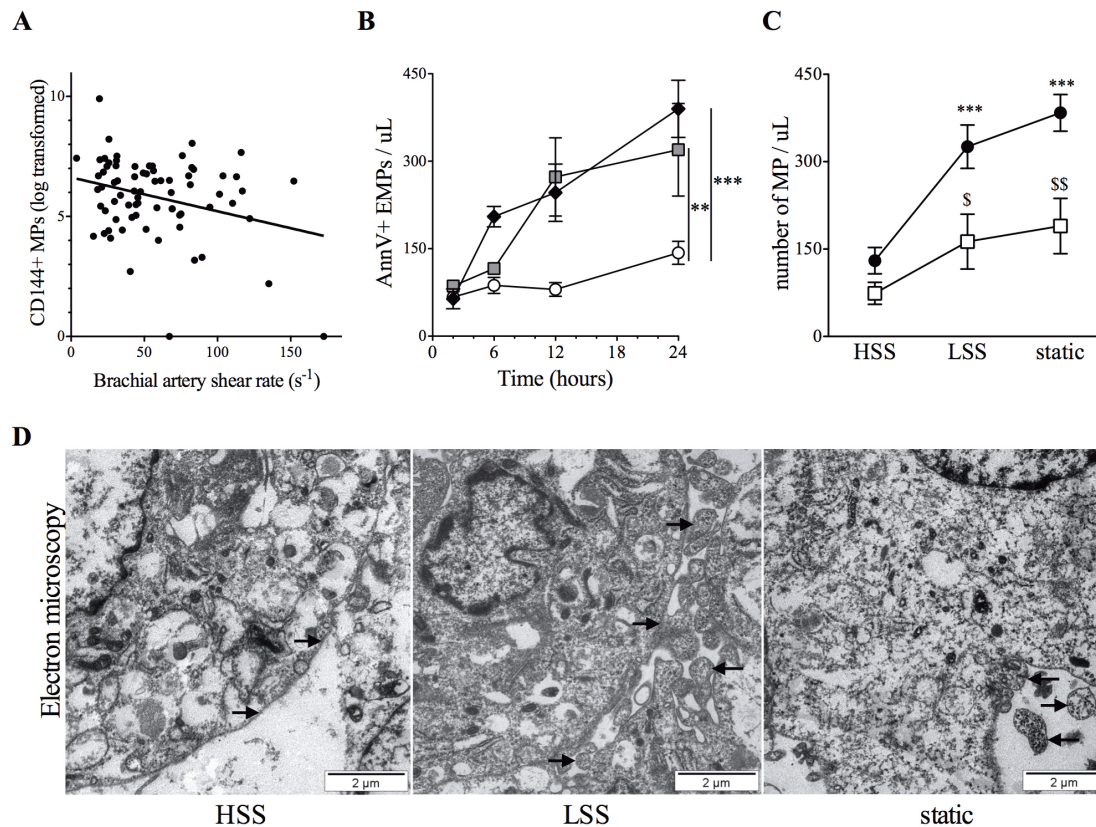
## References:

1. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature*. 1969;223(5211):1159-60. Epub 1969/09/13.
2. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*. 1997;185(4):601-7. Epub 1997/02/17.
3. Walpole PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(1):2-10. Epub 1995/01/01.
4. Bao X, Lu C, Frangos JA. Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):996-1003. Epub 1999/04/09.
5. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997;89(4):1121-32. Epub 1997/02/15.
6. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):772-7. Epub 2007/02/20.
7. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):27-33. Epub 2010/12/17.
8. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2000;101(21):2450-3. Epub 2000/06/01.
9. Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2007;49(4):902-8.
10. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariépy J, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2775-80. Epub 2006/10/14.
11. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien JL, Lefort M, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens*. 2010;28(4):789-96. Epub 2009/12/25.
12. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-52. Epub 2003/12/06.
13. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421. Epub 2002/12/18.
14. Chironi G, Craiem D, Miranda-Lacet J, Levenson J, Simon A. Impact of shear stimulus, risk factor burden and early atherosclerosis on the time-course of brachial artery flow-mediated vasodilation. *J Hypertens*. 2008;26(3):508-15. Epub 2008/02/28.
15. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3381-8.
16. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21722-9. Epub 2000/04/28.

17. Ramkhelawon B, Vilar J, Rivas D, Mees B, de Crom R, Tedgui A, Lehoux S. Shear stress regulates angiotensin type 1 receptor expression in endothelial cells. *Circ Res*. 2009;105(9):869-75. Epub 2009/09/19.
18. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104(9):2761-6. Epub 2004/07/10.
19. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. 2002;3(5):321-30. Epub 2002/04/23.
20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002/08/20.
21. Sapet C, Simoncini S, Lioriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 2006;108(6):1868-76.
22. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost*. 2009;7(4):701-9.
23. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):339-45.
24. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. 2001;3(4):346-52.
25. Randriamboavonjy V, Pistrosch F, Bolck B, Schwinger RH, Dixit M, Badenhoop K, Cohen RA, Busse R, Fleming I. Platelet sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and mu-calpain activity are altered in type 2 diabetes mellitus and restored by rosiglitazone. *Circulation*. 2008;117(1):52-60. Epub 2007/12/12.
26. Simak J, Holada K, Vostal JG. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol*. 2002;3:11.
27. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;104(1):93-102.
28. Mezentsev A, Merks RM, O'Riordan E, Chen J, Mendelev N, Goligorsky MS, Brodsky SV. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(3):H1106-14.
29. Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1898-907. Epub 2011/05/21.
30. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):566-73.
31. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett*. 1996;399(1-2):71-4. Epub 1996/12/09.
32. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):399-406.

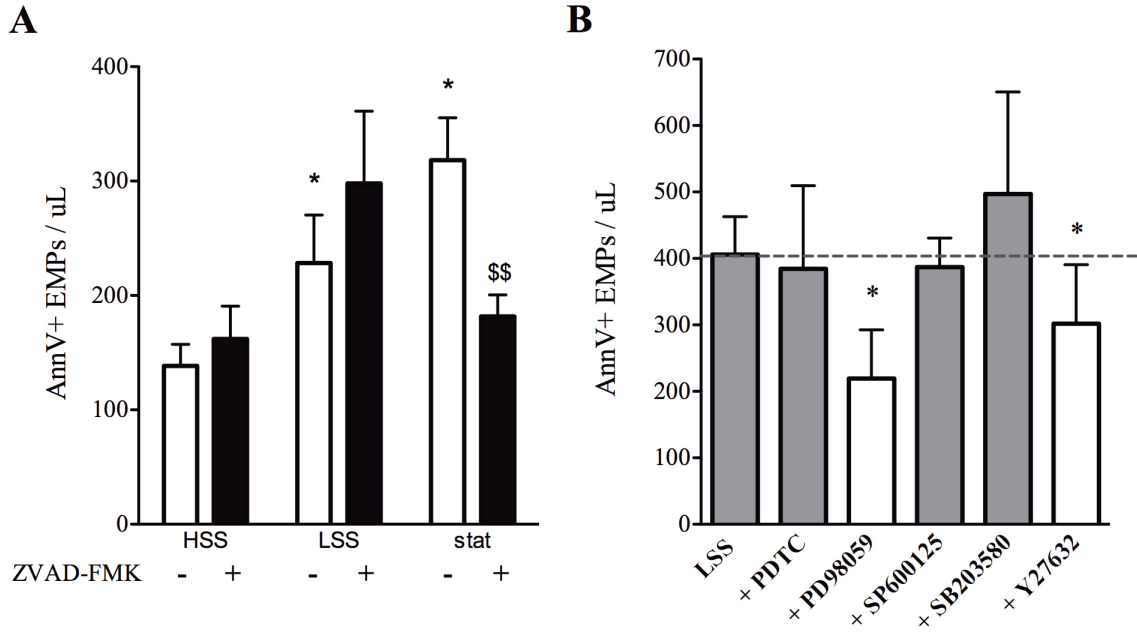
33. Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):321-30. Epub 2000/12/09.
34. Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*. 2003;44(2):233-42.
35. Combes V, Coltel N, Alibert M, van Eck M, Raymond C, Juhan-Vague I, Grau GE, Chimini G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol*. 2005;166(1):295-302. Epub 2005/01/06.
36. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, Vilar J, Tedgui A, Levy BI, Chimini G, Boulanger CM, Silvestre JS. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009;119(21):2808-17. Epub 2009/05/20.
37. Karten B, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J Biol Chem*. 2006;281(7):4049-57. Epub 2005/12/15.
38. Busse R, Fleming I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(1):24-9. Epub 2002/12/25.

## Figure - legends



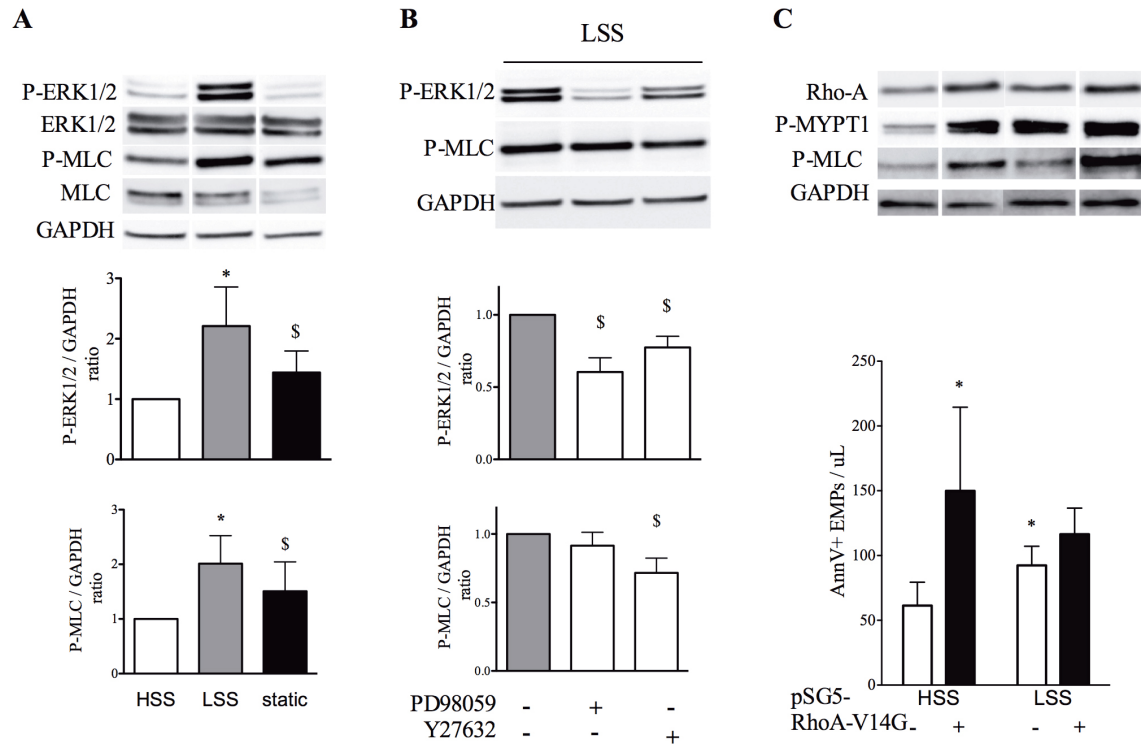
**Figure 1. Relationship between EMP and shear stress levels.**

**A:** Correlation between baseline brachial artery shear rate and CD144+ EMP level in patients ( $n=74$ ,  $r=-0.25$ ,  $p=0.009$ ). **B:** Timecourse of annexinV+EMP release *in vitro* (static: black diamond, low SS: grey square, high SS: white circle; 2-6h:  $N=4$ , 12h:  $N=5$ , 24h:  $N=17$ ). **C:** comparison of AnnV+ EMP level and CD144+ EMP level under different SS profiles *in vitro* (AnnV: black circle,  $N=17$ ; CD144+: white square,  $N=6$ ). EMPs were measured by flow cytometry (size of 0.1-1.0  $\mu m$  that stained positively for AnnexinV or CD144). AnnexinV labeling: \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$  (compared to HSS); CD144 labeling: \$\$ $p<0.01$ , \$ $p<0.05$  (compared to HSS). **D:** Membrane blebbing of HUVEC under different shear stress profile (from left to right: high SS: HSS; low SS: LSS; static condition: static) was observed by transmission electron microscopy (x9600; representative experiment out of 5). Black arrows indicate presence of membrane blebs in LSS and static conditions.



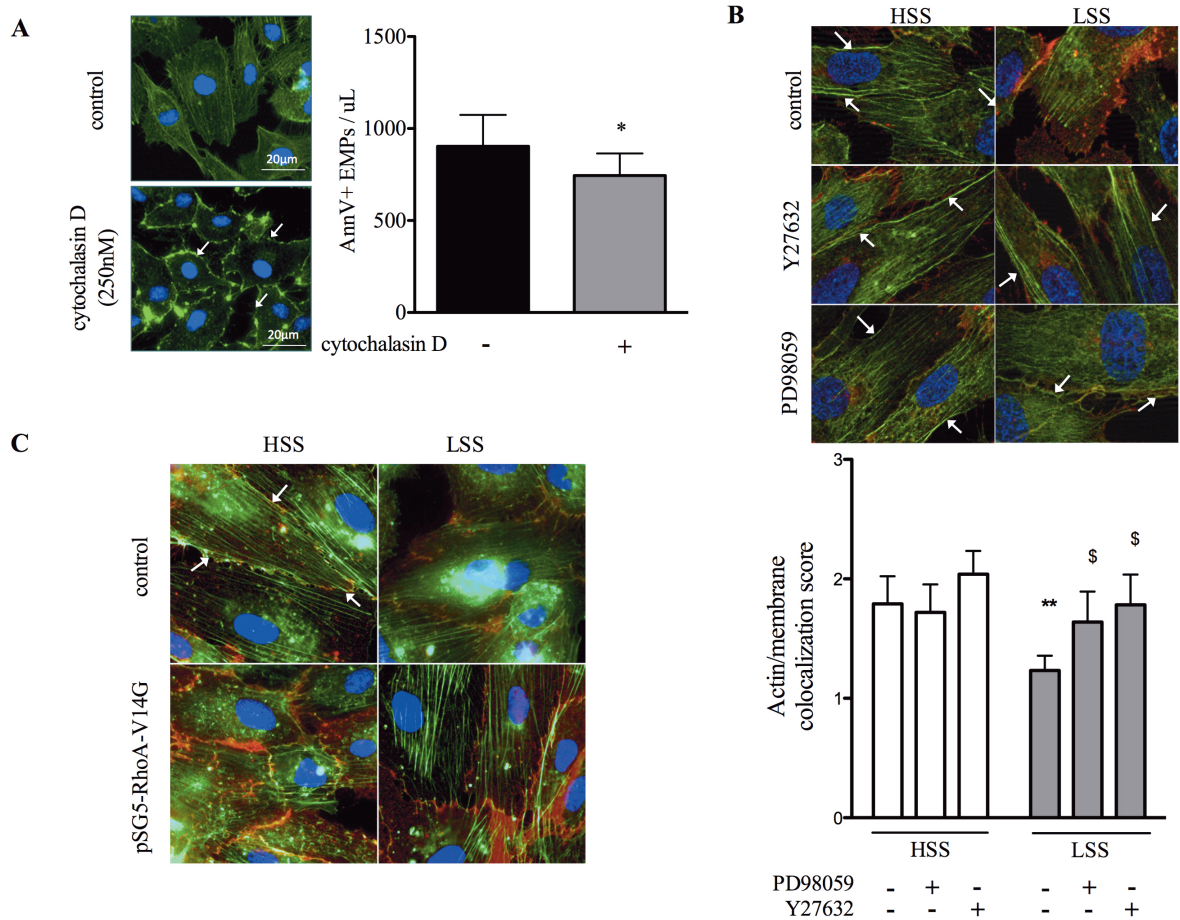
**Figure 2. Signaling pathways associated with EMP release.**

**A:** EMP level under different shear stress profile treated or not with ZVAD-FMK (pan-caspase inhibitor, 24h, N=8,  $2 \times 10^{-5}$  mol/L).  $*p < 0.05$  (compared to HSS),  $**p < 0.01$  (compared to untreated condition) **B:** effect of different inhibitor on EMP release under low SS (24h, N=6, NFkB inhibitor: PDTC,  $10^{-5}$  mol/L; ERK1/2 inhibitor: PD98059,  $10^{-5}$  mol/L; Jun-kinases inhibitor: SP600125,  $10^{-6}$  mol/L; p38 MAP-kinase inhibitor: SB203580,  $10^{-5}$  mol/L; ROCK inhibitor: Y27632,  $10^{-6}$  mol/L).  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$  (compared to untreated condition).



**Figure 3. Mechanisms involved in low SS-induced EMP release.**

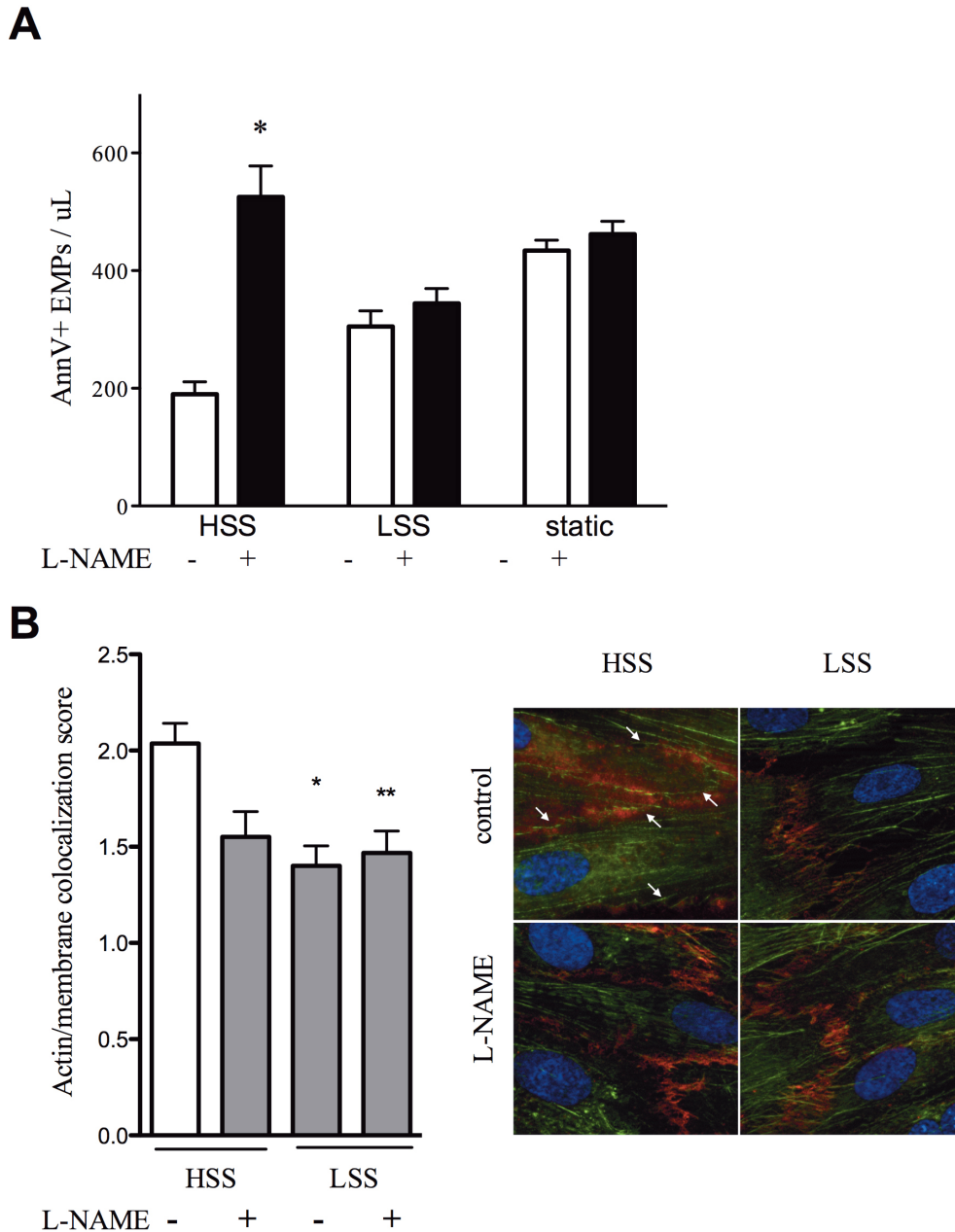
**A:** ERK1/2 and ROCK phosphorylation (12h, N=6), total ERK1/2 and MLC expression (N=4, representative blot) compared to GAPDH under different SS profiles. **B:** ERK1/2 and ROCK phosphorylation under low SS treated or not with ERK1/2 or ROCK inhibitors (12h, N=6), **C:** Bar graph showing the effect of constitutively active RhoA overexpression on EMPs level (N=5) and representative blots of RhoA, P-MYPT-1 and GAPDH expression in mocked and pSG5-RhoA-V14G-transfected endothelial cells showing the efficacy of plasmid expression in HUVECs under low and high SS. \* $p < 0.05$  (compared to HSS), \$ $p < 0.05$  (compared to LSS). Blots originated from a same membrane but were re-arranged to correspond to the current graphic presentation.



**Figure 4. Actin localization and EMP release.**

EMPs were measured by flow cytometry using AnnexinV staining and actin localization at the plasma membrane was measured by a score system (0: no colocalization to 3: total colocalization; F-actin : green, CD31 : red). **A:** effect of cytochalasin D treatment under static condition (24h,  $2.5 \cdot 10^{-7}$  mol/L, N=5), **B:** effect of ERK1/2 and ROCK inhibitor on actin localization under high SS or low SS (24h, N=5). **C:** Effect of RhoA over-expression on actin localization under high SS or low SS. \* $p < 0.05$  (compared to static condition), \*\* $p < 0.01$  (compared to HSS condition), \$ $p < 0.05$  (compared to LSS).

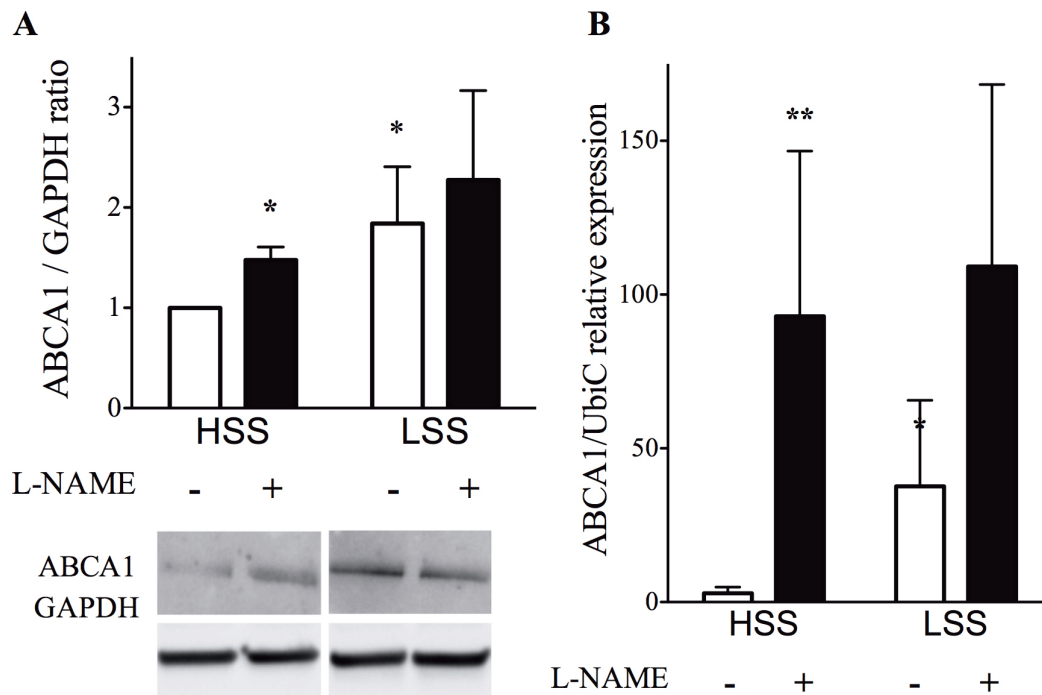




**Figure 5: NO contribution to EMP release by increasing polymerized actin at the plasma membrane.**

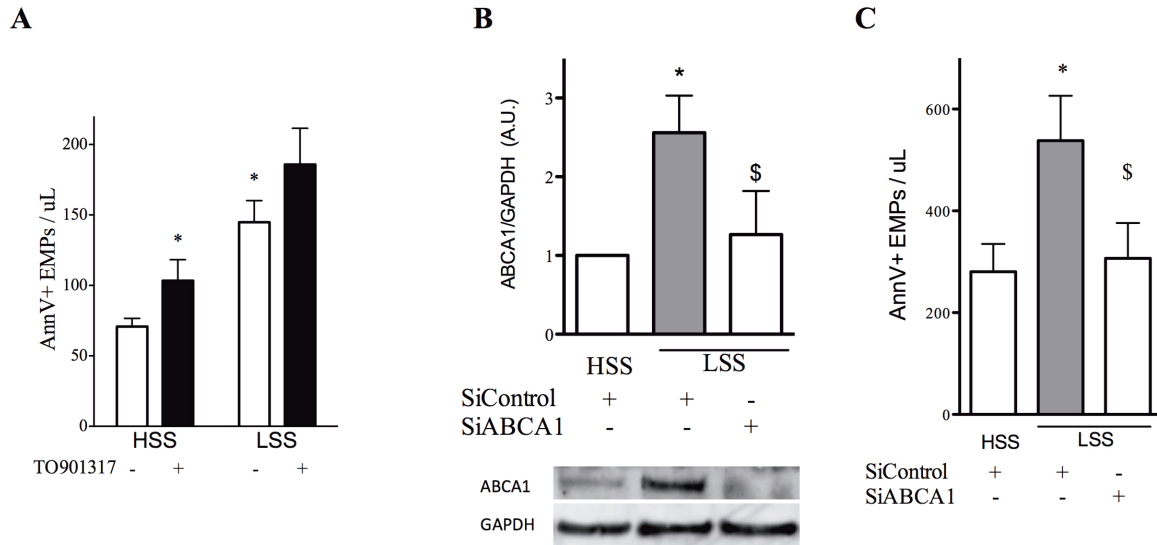
EMPs were measured by flow cytometry using AnnexinV staining and actin localization at the plasma membrane was measured by a score system (0: no colocalization to 3: total colocalization; F-actin : green, CD31 : red). **A.** Effect of L-NAME treatment on EMP release (24h, N=7,  $10^{-5}$  mol/L). **B.** Effect of L-NAME on actin localization (24h, N=5,  $10^{-5}$  mol/L). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (compared to untreated HSS condition).





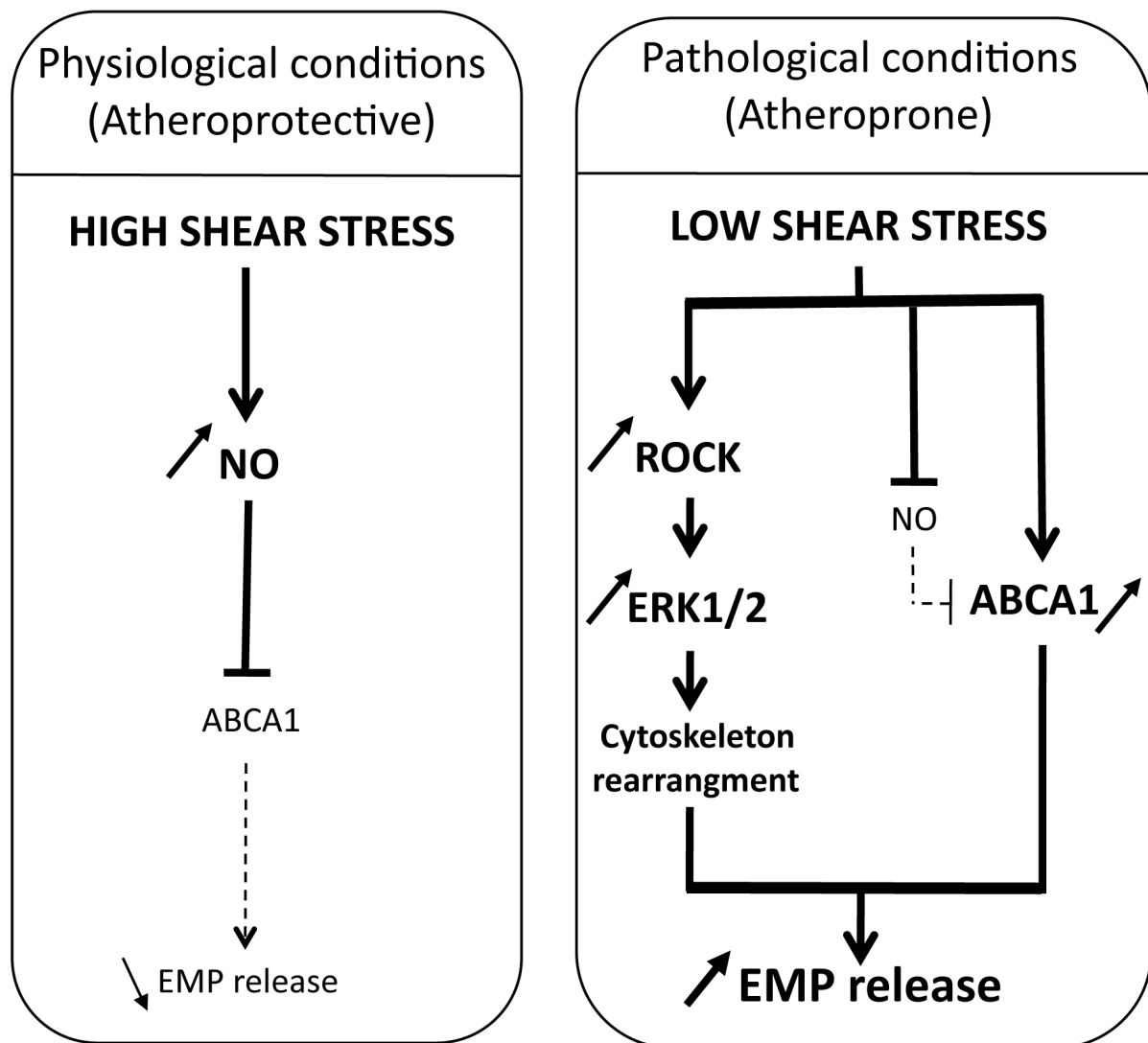
**Figure 6. ABCA1 expression in HUVECs is dependent of SS level and NO production.**

ABCA1 protein (A) and mRNA (B) levels were assessed by western blot and qPCR analysis, respectively; EMP release was quantified by flow cytometry using AnnV staining (C). **A:** effect of SS and L-NAME treatment on ABCA1 protein expression (24h, N=6), **B:** effect of SS and L-NAME treatment on ABCA1 mRNA expression (24h, N=7), \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (compared to HSS). Blots originated from a same membrane but were re-arranged to correspond to the current graphic presentation.



**Figure 7. ABCA1 expression in HUVECs modulates EMP release.**

ABCA1 protein (B) levels were assessed by western blot, EMP release was quantified by flow cytometry using AnnV staining (A-C). **A:** effect of TO90131 on EMP release under different shear stress profile (24h, N=5,  $10^{-7}$  mol/L). **B.** ABCA1 silencing efficassity under SS (24h, N=7,  $5 \times 10^{-8}$  mol/L), **C.** effect of ABCA1 silencing on EMP release under different shear stress profile (24h, N=7,  $5 \times 10^{-8}$  mol/L). \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (compared to HSS); \$ $p < 0.05$  (compared to LSS). Blots originated from a same membrane.



**Figure 7. Signaling pathways regulating SS-induced EMP release.**

Under physiological conditions (i.e. sustained exposure to high laminar shear stress; **LEFT**) endothelial cells release nitric oxide (NO), which clamps down endothelial ABCA1 expression, limiting membrane remodeling, phosphatidylserine exposure and EMP release. On the contrary, under pathological conditions (i.e. sustained exposure to low laminar shear stress; **RIGHT**), increased endothelial ROCK and ERK1/2 activities associated with cytoskeleton reorganization augment EMP release. This effect is reinforced by the loss of NO-induced down-regulation of ABCA1 expression.

Parameter	Values	
Age, years	50 ± 11	(22-77)
Male gender, n (%)	51	(69)
Hypertension, n (%)	36	(49)
Hypercholesterolemia, n (%)	29	(39)
Low HDL, n (%)	22	(30)
Diabetes, n (%)	7	(10)
Current smoking, n (%)	15	(20)
10-year Framingham risk, n (%)		
<10% at 10 years	45	(62)
10-20% at 10 years	22	(31)
>20% at 10 years	5	(7)
Brachial artery shear rate, s <sup>-1</sup>	55.5 ± 32.6	(3.7-152.2)
CD144+ microparticles, events/μL	450 ± 409	(0-2127)

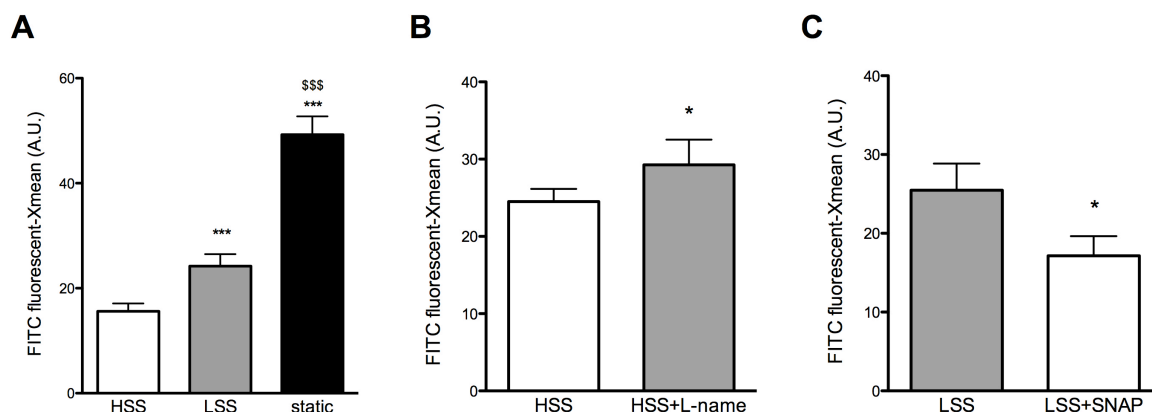
**Table 1.** Clinical characteristics. Risk of coronary heart disease was estimated by entering age, male sex, systolic pressure, total and HDL-cholesterol, presence or absence of smoking into the Framingham model equations and defined the 10-year coronary risk as low (<10%), intermediate (10-20%) or high (>20%). Data are means ± standard deviations or number of subjects, (n) with percentages.

### ***C.3. Travaux 3 : Contenu des microparticules endothéliales***

Un autre point majeur dans l'étude des microparticules est l'analyse de leur contenu. Comme expliqué dans l'introduction, les microparticules peuvent avoir une composition lipidique, protéique et ARN différente en fonction des stimuli permettant leur génération.

La phosphatidylsérine est une des molécules participant à l'activité prothrombotique des microparticules. Sa présence est nécessaire à l'activation de la prothrombinase (facteur X<sub>a</sub> complexé au facteur V<sub>a</sub>) permettant de transformer la prothrombine en thrombine. Je me suis donc intéressée à l'externalisation de la phosphatidylsérine sur les microparticules. J'ai montré dans l'étude précédente que l'externalisation de la phosphatidylsérine par la scramblase-1 et ABCA1 était un point important conduisant à la vésiculation sous faibles contraintes de cisaillement. Mais cette externalisation conduit-elle à une augmentation de la phosphatidylsérine à la surface des microparticules ?

Pour répondre simplement à cette question, j'ai analysé l'intensité de fluorescence des microparticules positives pour le marquage annexine V. En effet, plus une microparticule portera de phosphatidylsérine sur sa membrane externe plus le nombre de molécules d'annexine V se liant à la microparticule sera grand et donc plus la fluorescence de cette microparticule sera forte. L'analyse de ce degré de fluorescence (X-mean) a mis en évidence que les microparticules obtenues sous faibles contraintes de cisaillement, et encore plus en condition statique, présentaient une fluorescence significativement plus importante que celles obtenues sous fortes contraintes de cisaillement (fortes contraintes de cisaillement : HSS  $15,6 \pm 1,4$  ; faibles contraintes de cisaillement : LSS  $24,2 \pm 2,3$  ; statique  $49,3 \pm 3,5$  ; unité arbitraire ; Figure 38A). L'inhibition de la NOS sous fortes contraintes de cisaillement induit l'augmentation de cette fluorescence et l'addition de NO exogène la diminue significativement (Figure 38B et C), suggérant un rôle du NO dans la présence de phosphatidylsérine à la surface des microparticules. Ce rôle pourrait être lié à la modulation d'expression de floppases comme ABCA1.

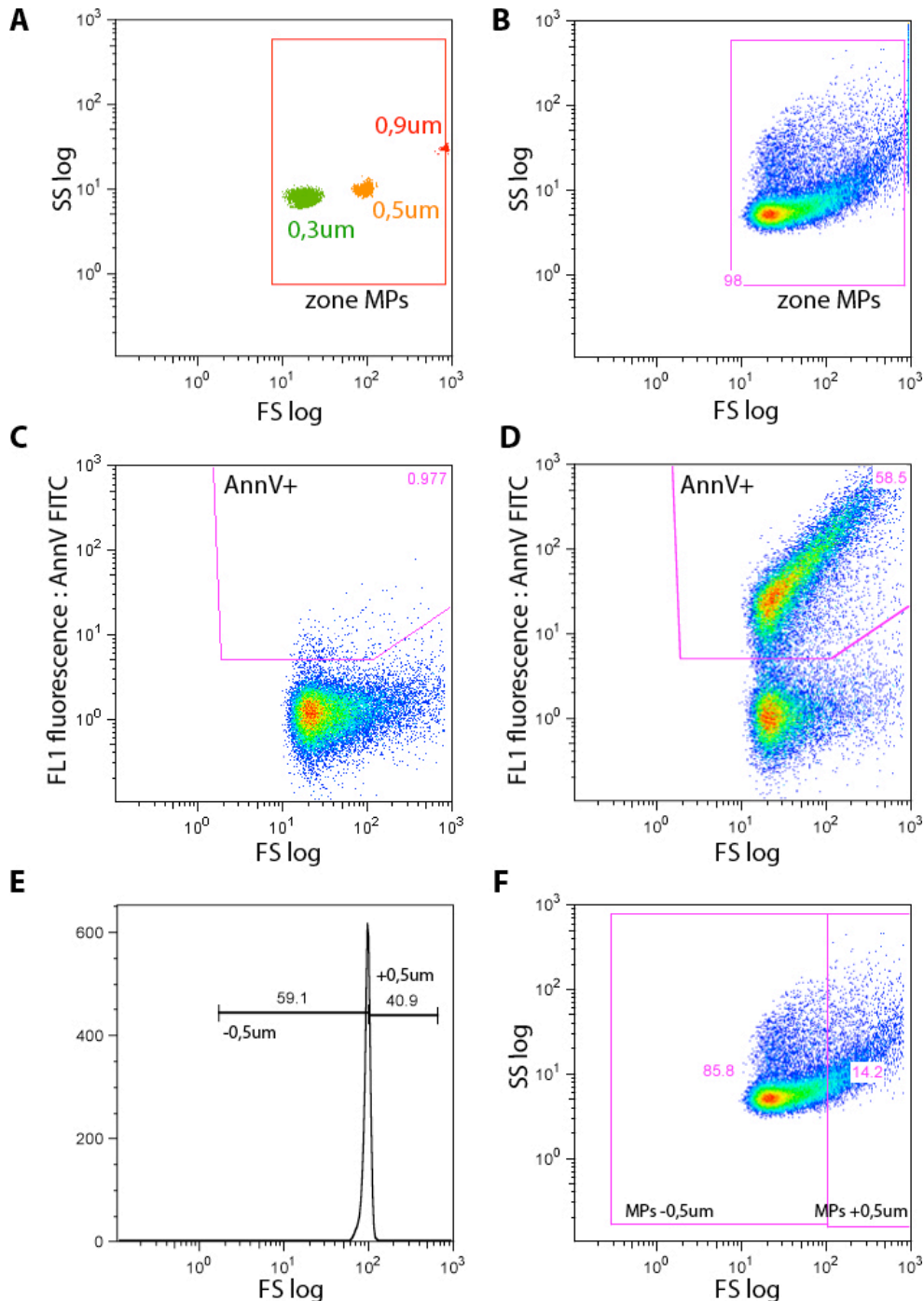


**Figure 38 : Analyse de la variation de fluorescence des microparticules, représentative du taux de phosphatidylsérine externalisé.**

A. effets des contraintes de cisaillement sur le degré de fluorescence des microparticules, N=17. B. effet du L-NAME sur le degré de fluorescence des microparticules sous fortes contraintes de cisaillement. C. effet du SNAP sur le degré de fluorescence des microparticules sous faibles contraintes de cisaillement. Test de Wilcoxon. \* $p < 0.05$  comparé aux fortes contraintes de cisaillement, \*\*\* $p < 0.001$  comparé aux fortes contraintes de cisaillement, \$\$\$ $p < 0.001$  comparé aux faibles contraintes de cisaillement. Données non publiées.

La modification du degré de fluorescence suite au marquage par l'annexine V suggère que les microparticules générées sous faibles contraintes de cisaillement et en condition statique expriment plus de phosphatidylsérine à leur surface et ont potentiellement un pouvoir pro-coagulant accentué. Les mécanismes responsables de cet « empaquetage » n'ont pas encore été identifiés mais il apparaît que le NO soit un des élément clé, certainement de par son influence sur l'expression de floppase comme ABCA1. Dans ce cas précis, nous sommes également confrontés à une limitation majeure : nous n'évaluons pas cette fluorescence en fonction de la taille de l'évènement. Cependant, une « grosse » microparticule exprimant peu de phosphatidylserine sera plus fluorescente qu'une « petite » en exprimant beaucoup. Pour répondre à cela, l'équipe a acquis ces derniers mois un nouveau cytomètre de flux (Galios, Beckman Coulter) qui nous a permis d'augmenter la sensibilité de nos mesures de microparticules, à la fois en taille détectée, en fluorescence et en nombres d'évènements quantifiés. La particularité de cette nouvelle génération de cytomètre est d'avoir une résolution en « forward scatter » (diffraction du laser, relatif à la taille de l'évènement) augmentée et un seuil de bruit de fond plus bas que les génération précédentes, permettant une quantification plus précise des microparticules, en particulier celles de petite taille <sup>330</sup>. Nous avons donc travaillé avec des paramètres nous permettant de visualiser au mieux la zone microparticulaire (Figure 39A), une fois cette zone microparticulaire établie, nous avons pu évaluer le pourcentage, le degré de

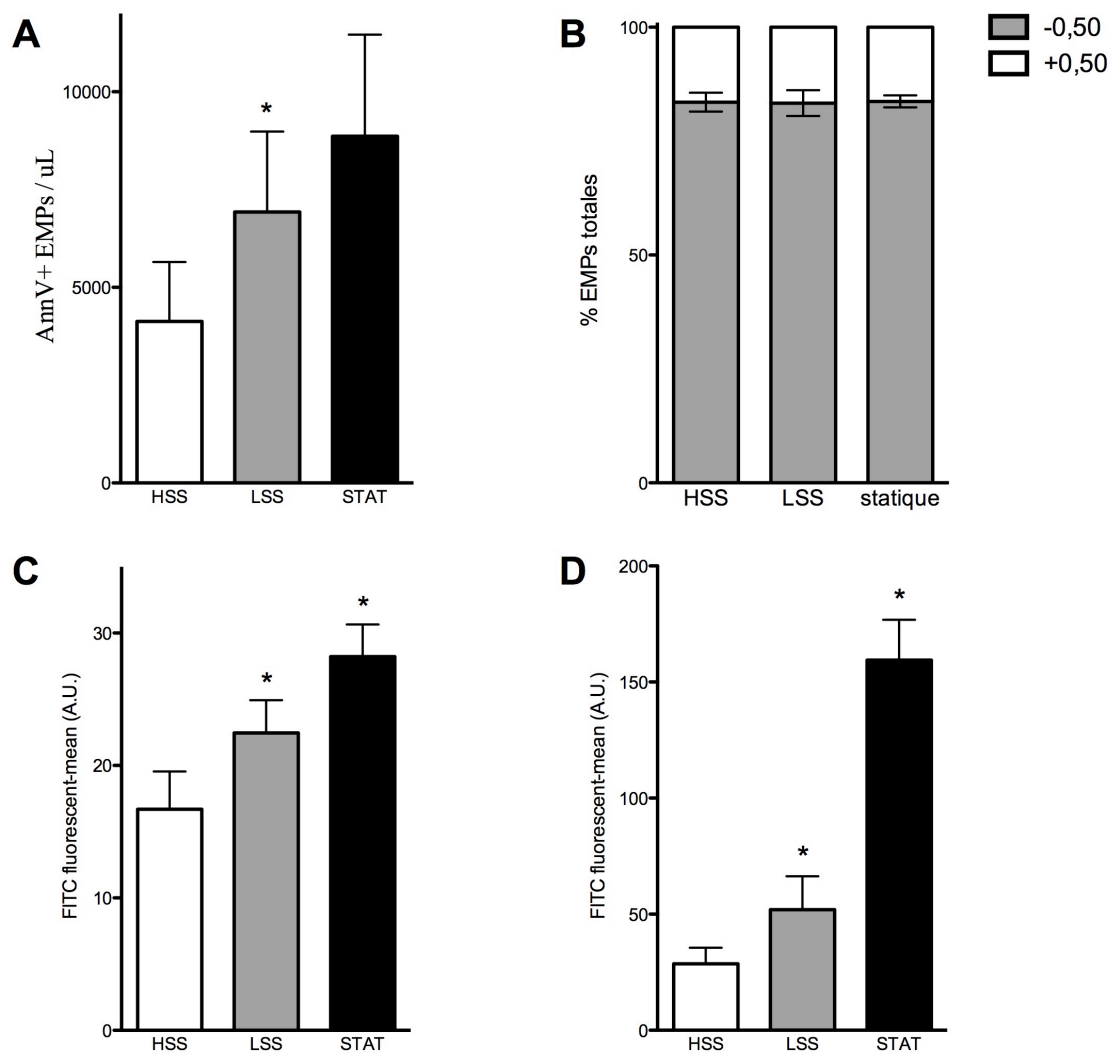
fluorescence et quantifier les microparticules de manière similaire à ce qui a été fait sur EPICS (Figure 39B à D). Pour évaluer la répartition des microparticules au sein de la zone microparticulaire nous avons défini deux zones grâce aux billes de 0,5  $\mu\text{m}$  en nous positionnant au niveau de la valeur de forward scatter présentant le plus grand nombre de billes (pic de l'histogramme, Figure 39E, F).



**Figure 39 : Méthode d'analyse avec le GALLIOS**

A. Définition de la zone microparticulaire grâce à des billes de calibration. B. Visualisation des éléments contenus dans la zone microparticulaire. C. Fluorescence des microparticules pour le marquage non spécifique (en présence d'EDTA). D. Fluorescence des microparticules pour le marquage en présence de calcium. E. Définition de la zone inférieure à 0,5  $\mu\text{m}$  et de la zone supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$  grâce aux billes de calibration de 0,5  $\mu\text{m}$ . F. Répartition des microparticules AnnV+ entre les deux zones.

Premièrement, nous avons confirmé les effets des forces de cisaillement sur la production de microparticules endothéliales (Figure 40A). Deuxièmement, nous avons montré que les microparticules sont réparties de façon similaire en terme de taille (inférieur à 0,5  $\mu\text{m}$  / entre 0,5 et 1 $\mu\text{m}$ ) quelques soient les forces de cisaillement (Figure 40B). Enfin, nous confirmons l'influence des contraintes de cisaillement sur le degré de fluorescence des microparticules et ce, que l'on considère les microparticules au dessous de 0,5 $\mu\text{m}$  (Figure 40C) ou au dessus de 0,5 $\mu\text{m}$  (Figure 40D).



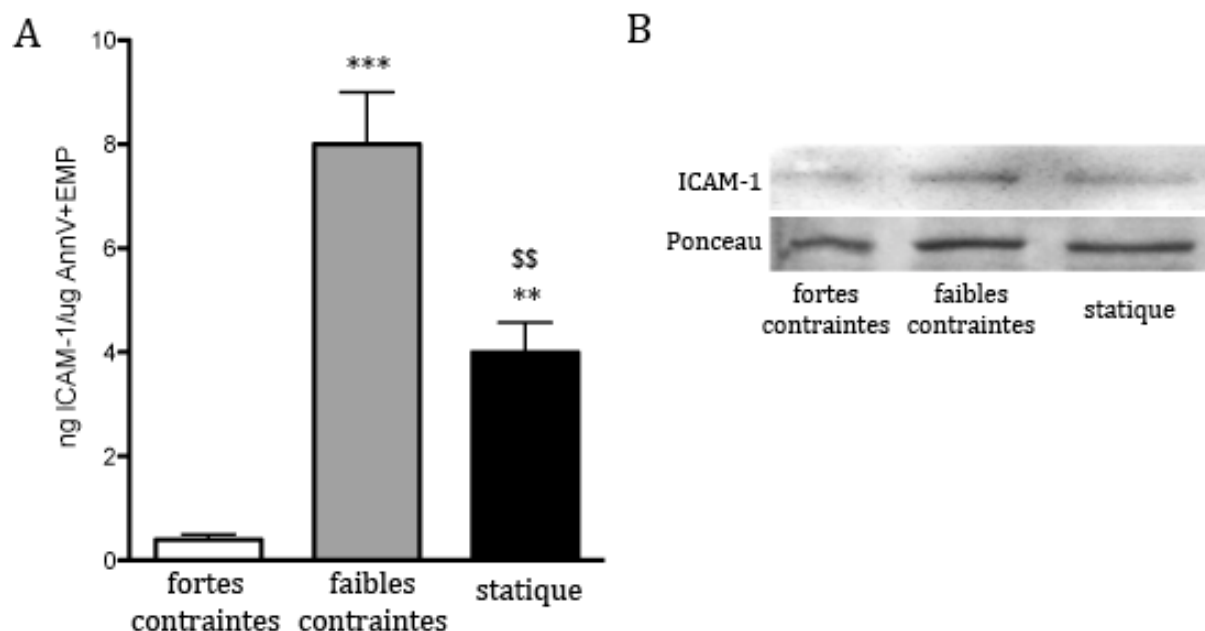
**Figure 40 : Analyse et quantification des microparticules par utilisation du GALLIOS.**

A : Effet des contraintes de cisaillement sur le taux de microparticules AnnV+. B. Répartition des microparticules AnnV+ entre zone supérieure à 0,5 $\mu\text{m}$  et zone inférieure à 0,5 $\mu\text{m}$ . C. Analyse de la fluorescence des microparticules inférieures à 0,5 $\mu\text{m}$ . D. Analyse de la fluorescence des microparticules supérieures à 0,5 $\mu\text{m}$ . N=6, \*p<0,05 comparé au condition de fortes contraintes de cisaillement. HSS : fortes contraintes, LSS : faibles contraintes. Données non publiées.



Ces résultats sur le degré d'externalisation de la phosphatidylsérine à la surface des microparticules endothéliales suggèrent que les microparticules libérées sous faibles contraintes de cisaillement pourraient avoir un potentiel procoagulant plus important. Cette hypothèse devrait être confirmée par des investigations supplémentaires, notamment par l'étude du temps de coagulation induite par ces microparticules et par l'évaluation de l'expression et de l'activité du facteur tissulaire.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au contenu protéique des microparticules endothéliales. Sachant que les faibles contraintes de cisaillement induisent l'expression de molécules d'adhésion au niveau endothélial, nous avons évalué l'expression de différentes molécules d'adhésion sur les microparticules obtenues sous différentes contraintes de cisaillement. Pour cela, Bhama Ramkhelawon et moi avons réalisé différents ELISA pour ICAM-1, P-Sélectine, E-Sélectine et VCAM-1. Les culots de microparticules ressuspendus ont été analysés, ainsi que le surnageant dépourvu de microparticules, dans le but de discriminer la concentration réelle en protéine présente sur les microparticules de la concentration due à la fraction soluble dans le surnageant. Nous n'avons pas pu détecter la présence d'E-Sélectine, de P-Sélectine ou de VCAM-1 à la surface des microparticules, et ce quelques soient les conditions de cisaillement utilisées. Cependant, nous avons pu détecter la présence d'ICAM-1. Les microparticules générées sous faibles contraintes de cisaillement présentent une concentration d'ICAM-1 20 fois supérieure à celle obtenue sous fortes contraintes de cisaillement (Figure 41A). Nous avons également confirmé cette expression par Western blot et nous avons observé que les microparticules obtenues sous faibles contraintes de cisaillement expriment plus fortement ICAM-1 que celles produites sous fortes contraintes de cisaillement ou en condition statique (Figure 41B).



**Figure 41 : Expression d'ICAM-1 sur les microparticules endothéliales générées sous différentes contraintes de cisaillement**

A. quantification d'ICAM-1 porté par les microparticules par ELISA, N=11, Test de wilcoxon, \*\*\*p<0.001 comparé au statique, \*\*p<0.01 comparé aux faibles contraintes de cisaillement.. B. Evaluation de l'expression d'ICAM-1 par western blot, N=3 images représentatives. Données non publiées.

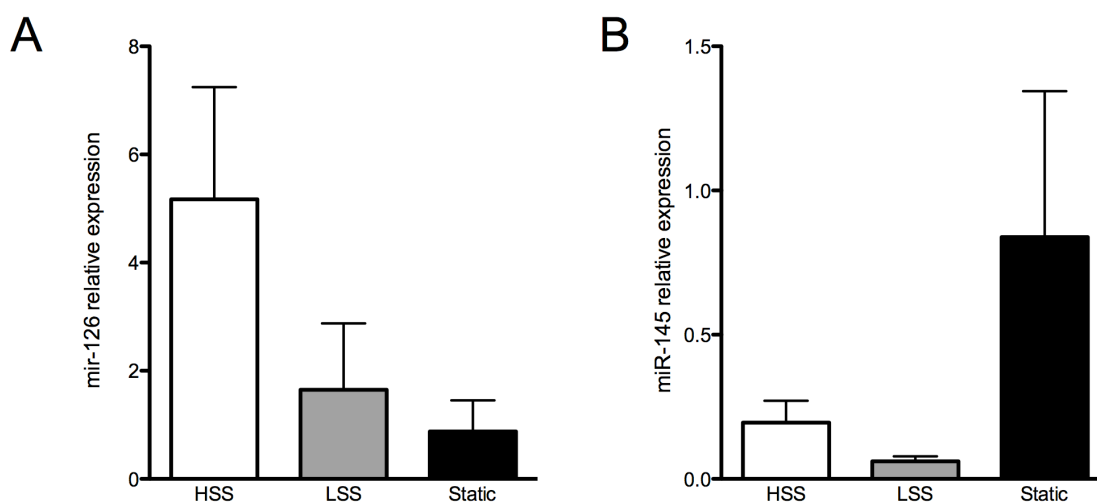
Ces résultats montrent que les contraintes de cisaillement régulent directement la composition protéique des microparticules en régulant l'expression d'ICAM-1 à leur surface. Un point intéressant est que la E-sélectine n'est pas détectée à la surface des microparticules alors qu'elle est connue pour être surexprimée sur des cellules endothéliales soumises à de faibles contraintes de cisaillement. Cela suggère qu'il existerait des mécanismes actifs et sélectifs d'embarquement de protéines à la surface des microparticules, ou alors que l'empaquetage d'E-selectine a lieu mais à des niveaux sous le seuil de détection dans nos conditions expérimentales.

#### ***C.4. Travaux 4 : MicroARN, microparticules endothéliales et condition pro-athérogène***

Plusieurs études ont montré que les vésicules cellulaires peuvent contenir des microARN et servir de transporteur. Au sein du laboratoire, le Dr Xavier Loyer a montré que les contraintes de cisaillement influent directement sur le profil d'expression de nombreux microARN dans la cellule endothéliale (données non publiées). Notre troisième hypothèse a donc été que les microparticules endothéliales peuvent être enrichies en différents microARN en fonction des contraintes de cisaillement qui ont permis leur génération.

Brièvement, L'ARN a été extrait directement du culot de microparticules, les microARN ont été quantifiés par qPCR en utilisant un microARN rapporteur : U6. Puis le rapport a été ajusté en fonction du nombre de microparticules Annexine V positives contenues dans le culot.

Différents microARN ont été étudiés. Xavier Loyer et moi avons pu mettre en évidence que les microparticules endothéliales contenaient bien des microARN et que le contenu variait en fonction des contraintes de cisaillement. Ainsi le miR-126 est fortement emballé dans les microparticules générées sous fortes contraintes de cisaillement en comparaison au contenu de celles générées sous faibles contraintes ou en condition statique (Figure 42A). A l'inverse, le miR-145 est largement retrouvé dans les microparticules générées en condition statique ; les contraintes de cisaillement diminuent fortement son emballage, l'influence des contraintes appliquées semble faible mais confirme cependant des résultats publiés par une autre équipe <sup>174</sup> qui montre que l'emballage du miR-145 est augmenté sous fortes contraintes de cisaillement en comparaison aux conditions de faibles contraintes (Figure 42B).

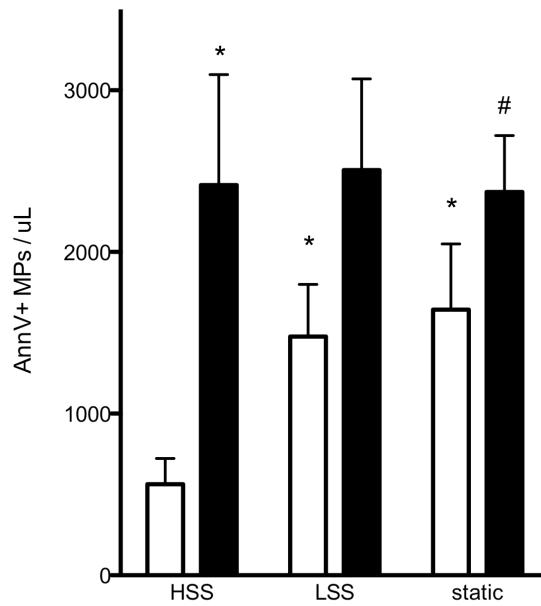


**Figure 42 : Quantification des microARN présent dans les microparticules en fonction des contraintes de cisaillement**

A. Quantification du miR-126 par qPCR. B. Quantification du miR-145. Résultats préliminaires, N=3, non publiés.

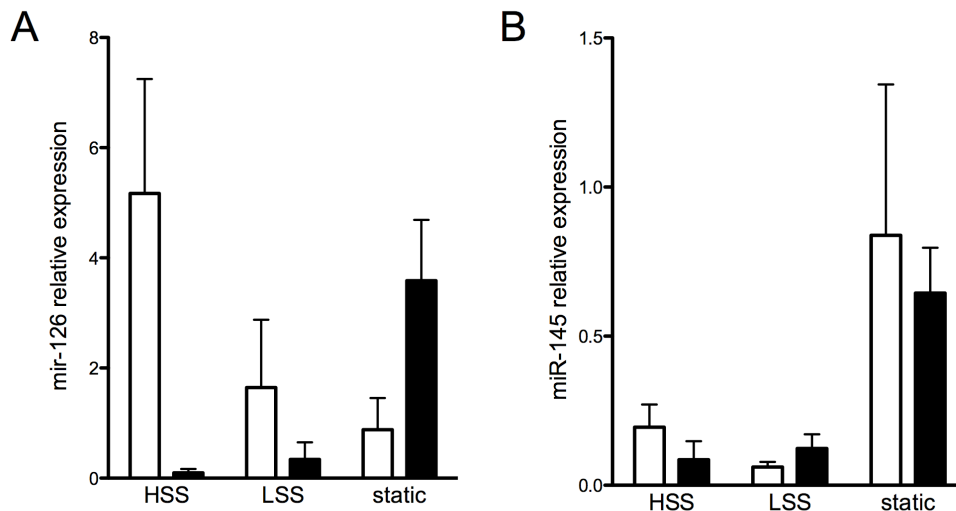
Il est à noter que l’empaquetage des microARN dans les microparticules semble bien être un mécanisme actif puisque le miR-126 n’est pas régulé par les contraintes de cisaillement dans les cellules endothéliales. Les mécanismes moléculaires régulant l’empaquetage des microARN dans les microparticules restent pour l’instant encore inconnus et pourraient constituer une piste intéressante d’investigations futures dans le cadre de la vectorisation de ces microARN.

En complément de ces travaux, j’ai aussi évalué l’effet de conditions pro-athérogènes combinées à différentes conditions de contraintes de cisaillement sur la production de microparticules. *In vitro*, les conditions pro-athérogènes ont été reproduites en traitant les cellules avec des lipides oxydés de faible densité (LDL oxydées). L’ajout de LDL oxydées augmente de 5 fois le taux de microparticules obtenues sous fortes contraintes de cisaillement, l’effet sous faibles contraintes de cisaillement est quant-à-lui plus modéré, tout comme sous condition statique (Figure 43). Globalement, nous avons constaté qu’en présence de LDL oxydées, les contraintes de cisaillement n’avaient plus d’effet sur les taux de microparticules endothéliales. Ainsi l’effet protecteur des fortes contraintes de cisaillement est aboli par l’ajout d’un facteur pro-athérogène.



**Figure 43 : Effet d'un traitement par les LDL oxydés sur la production de microparticules endothéliales**  
Quantification des microparticules endothéliales par cytométrie en flux obtenues sous différentes contraintes de cisaillement traitées (noir) ou non (blanc) avec des LDL oxydées. 25 µg/mL, N=6, test de wilcoxon, \*p<0.05 comparé aux fortes contraintes de cisaillement, #p<0.05 comparé à la condition statique. LSS : faibles contraintes, HSS fortes contraintes.

Nous avons ensuite entrepris de déterminer l'effet possible des LDL oxydées sur l'emballage des microARN dans les microparticules.



**Figure 44 : Effet des LDL oxydés sur l'emballage des microARN**  
A. Effet des LDL oxydées (noir) sur le miR-126. B. Effet des LDL oxydées (noir) sur le miR-145. Résultats préliminaires, N=3, non publiés.

De manière intéressante, l'emballage du miR-126 est fortement influencé par l'ajout de LDL oxydées (Figure 44A). Alors que les fortes contraintes augmentent le

contenu en miR-126 dans les microparticules, cet effet est complètement perdu en condition pro-athérogène ; de plus, les microparticules générées en condition statique, et qui présentaient un taux très faible de miR-126, voient leur contenu augmenté (Figure 44A). En opposition, les conditions pro-athérogènes ne semblent avoir aucun effet sur l’empaquetage du miR-145 dans les microparticules (Figure 44B).

Ces deux microARN illustrent donc que l’empaquetage des microARN dans les microparticules n’est pas simplement un mécanisme passif dû à la capture du cytoplasme dans les microparticules. Certains stimuli vont permettre de moduler le contenu microparticulaire indépendamment du contenu cellulaire et vont agir spécifiquement sur certains microARN.

### ***C.5. Travaux 5 : Microparticules, transfert d'ICAM1 et recrutement monocytaire***

#### **ARTICLE 3 : « Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1-Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration »**

Cette étude concerne la dernière étape dans la compréhension des microparticules : étudier leur effets biologiques et leur contribution à une pathologie. Cette étude porte non plus sur les microparticules circulantes mais sur les microparticules isolées de plaque d'athérosclérose. Alors que l'équipe avait montré que les microparticules de plaque d'athérosclérose contribuaient à l'angiogénèse intra-plaque, l'hypothèse était qu'en plus de leur potentiel pro-angiogénique, les microparticules pouvaient participer à l'adhésion et au recrutement monocytaire.

Durant ma thèse j'ai pu contribuer aux travaux menés par le Dr Pierre-Emmanuel Rautou montrant que les microparticules de plaques portaient ICAM-1 à leur surface alors que VCAM-1 et la e-Sélectine n'ont pas pu être détectées. L'incubation des microparticules avec des cellules endothéliales entraîne très rapidement l'expression d'ICAM-1 à leur surface. Cette expression provient d'un transfert de la molécule des microparticules aux cellules endothéliales et non d'un effet transcriptionnel puisque l'ARN messager d'ICAM-1 endothélial n'est pas modulé. Les inhibitions des voies PI3 kinase, de NFκB, ERK1/2 ou PKC activant la traduction d'ICAM-1 ne préviennent pas l'augmentation d'expression d'ICAM-1, confirmant l'hypothèse du transfert. De plus, il a montré que ce transfert est médié par la reconnaissance de la phosphatidylserine présente sur les microparticules et par fusion des microparticules avec la membrane de la cellule hôte.

Nous avons pu confirmé ce transfert en utilisant des cellules COS-7 (cellule fibroblastiques de reins de singe) qui sont connues pour ne pas exprimer ICAM-1, même sous stimulation <sup>328</sup>. L'incubation avec des microparticules de plaques permet une expression d'ICAM-1 à la surface des COS-7, de plus nous avons prouvé que la molécule transférée est biologiquement active puisque l'utilisation d'un anticorps activant permet la phosphorylation de ERK1/2, effecteur aval d'ICAM-1. Enfin, il a montré que ce transfert d'ICAM-1 est relevant physiologiquement puisque le recrutement de monocytes *in vitro* et *ex vivo* est augmenté en condition statique ainsi que la

transmigration. Nous avons également montré que des conditions dynamiques de faibles et de fortes contraintes de cisaillement ne modifiaient pas ce résultat, l'adhésion étant encore une fois augmentée suite à l'incubation avec les microparticules de plaque.



**Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1 –Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration**  
Pierre-Emmanuel Rautou, Aurélie S. Leroyer, Bhama Ramkhalawon, Cécile Devue, Dominique Duflaut, Anne-Clémence Vion, Gilles Nalbone, Yves Castier, Guy Leseche, Stéphanie Lehoux, Alain Tedgui and Chantal M. Boulanger

*Circulation Research* 2011, 108:335-343: originally published online December 16, 2010

doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237420

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2010 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/content/108/3/335>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2010/12/16/CIRCRESAHA.110.237420.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Circulation Research is online at  
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:  
[journalpermissions@lww.com](mailto:journalpermissions@lww.com)

Reprints: Information about reprints can be found online at  
<http://www.lww.com/reprints>

# Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1–Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration

Pierre-Emmanuel Rautou, Aurélie S. Leroyer, Bhama Ramkhalawon, Cécile Devue, Dominique Duflaut, Anne-Clémence Vion, Gilles Nalbone, Yves Castier, Guy Leseche, Stéphanie Lehoux, Alain Tedgui, Chantal M. Boulanger

**Rationale and Objective:** Membrane-shed submicron microparticles (MPs) released following cell activation or apoptosis accumulate in atherosclerotic plaques, where they stimulate endothelial proliferation and neovessel formation. The aim of the study was to assess whether or not MPs isolated from human atherosclerotic plaques contribute to increased endothelial adhesion molecules expression and monocyte recruitment.

**Method and Results:** Human umbilical vein and coronary artery endothelial cells were exposed to MPs isolated from endarterectomy specimens (n=62) and characterized by externalized phosphatidylserine. Endothelial exposure to plaque, but not circulating, MPs increased ICAM-1 levels in a concentration-dependant manner (3.4-fold increase) without affecting ICAM-1 mRNA levels. Plaque MPs harbored ICAM-1 and transferred this adhesion molecule to endothelial cell membrane in a phosphatidylserine-dependent manner. MP-borne ICAM-1 was functionally integrated into cell membrane as demonstrated by the increased ERK1/2 phosphorylation following ICAM-1 ligation. Plaque MPs stimulated endothelial monocyte adhesion both in culture and in isolated perfused mouse carotid. This effect was also observed under flow condition and was prevented by anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 neutralizing antibodies. MPs isolated from symptomatic plaques were more potent in stimulating monocyte adhesion than MPs from asymptomatic patients. Plaque MPs did not affect the release of interleukin-6, interleukin-8, or MCP-1, nor the expression of VCAM-1 and E-selectin.

**Conclusion:** These results demonstrate that MPs isolated from human atherosclerotic plaques transfer ICAM-1 to endothelial cells to recruit inflammatory cells and suggest that plaque MPs promote atherosclerotic plaque progression. (*Circ Res.* 2011;108:335-343.)

**Key Words:** microparticle ■ ICAM-1 ■ adhesion ■ monocyte ■ microvesicle

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by the accumulation of leukocytes, lipids, and fibrous tissue in the intima of arteries.<sup>1</sup> In atherosclerotic plaques, endothelial cells express elevated amounts of adhesion molecules such as selectins (P-selectin and E-selectin) and intercellular (ICAM-1) and vascular (VCAM-1) adhesion molecules at their surface.<sup>1,2</sup> Cytokines and chemokines are also secreted in excess by activated vascular cells in this context. These conditions favor the recruitment and the accumulation of monocytes and lymphocytes in the intima of vessels.<sup>1,2</sup>

Human atherosclerotic plaques contain large amounts of microparticles (MPs), which are submicron membrane vesicles released following cell activation or apoptosis.<sup>3–5</sup> MPs harbor at their surface most of the membrane-associated

proteins of the cells they stem from and are characterized by the loss of plasma membrane asymmetry resulting in the exposure of phosphatidylserine on their outer leaflet.<sup>6,7</sup> MPs isolated from human atherosclerotic lesions are highly thrombogenic and originate from multiple cells, including macrophages, lymphocytes, erythrocytes, and smooth muscle and endothelial cells.<sup>4,5</sup> MPs are no longer taken as innocent bystanders because several studies point out that MPs generated in vitro from cultured cells can affect several cellular functions, including inflammatory responses.<sup>8–15</sup> However, the interpretation of such studies is difficult because lipid and protein fractions of MPs, and thus likely MPs effects, greatly vary depending on the stimulus initiating cell blebbing and MP release.<sup>9,16</sup>

Original received November 22, 2010; revision received December 6, 2010; accepted December 8, 2010. In November 2010, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 13.2 days.

From INSERM U970 (P.-E.R., A.S.L., B.R., C.D., D.D., A.-C.V., Y.C., S.L., A.T., C.M.B.), Paris Cardiovascular Research Center PARCC, France; Université Paris Descartes (P.-E.R., A.S.L., B.R., C.D., D.D., A.-C.V., Y.C., A.T., C.M.B.), UMR-S970, France; INSERM U626 (G.N.), Marseille, France; Université de la Méditerranée (G.N.), Marseille, France; Vascular Surgery Department (Y.C., G.L.), Assistance Publique Hôpitaux de Paris, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France; and Lady Davis Institute, McGill University (S.L.), Montreal, Canada.

Correspondence to Chantal M. Boulanger, PhD, Paris Centre de recherche Cardiovasculaire à l'HEGP, INSERM U970, 56, rue Leblanc, 75737 Paris cedex 15, France. E-mail [chantal.boulanger@inserm.fr](mailto:chantal.boulanger@inserm.fr)

© 2011 American Heart Association, Inc.

*Circulation Research* is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237420

**Non-standard Abbreviations and Acronyms**

<b>AnnV</b>	annexin V
<b>HCAEC</b>	human coronary artery endothelial cell
<b>HUVEC</b>	human umbilical vein endothelial cell
<b>ICAM</b>	intercellular adhesion molecule
<b>LFA-1</b>	lymphocyte function associated antigen-1
<b>MP</b>	microparticle
<b>PMA</b>	phorbol-12-myristate-13-acetate
<b>PMN</b>	polymorphonuclear
<b>PSGL-1</b>	P-selectin glycoprotein ligand-1
<b>sICAM</b>	soluble intercellular adhesion molecule
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>VCAM</b>	vascular cell adhesion molecule

In view of these data, we tested the hypothesis that MPs isolated from human atherosclerotic plaques can regulate the inflammatory response of endothelial cells, increasing adhesion of monocytes to endothelium and transendothelial migration.

## Methods

### Isolation and Characterization of MPs From Human Endarterectomy Specimens and Plasma

This study, approved by our Hospital Review Board, included 62 patients undergoing carotid endarterectomy who gave their informed consent before inclusion (Table 1). MPs were isolated from human atherosclerotic plaques according to a previously described procedure, which does not generate MPs from healthy human arteries<sup>4</sup> (see the Online Data Supplement, available at <http://circres.ahajournals.org>). All experiments were performed with pelleted MPs gently resuspended in fresh DMEM and compared with the effects either of DMEM alone or of the supernatant obtained after pelleting MPs from plaque homogenates and filtered successively on 0.22- and 0.1- $\mu$ m membranes to completely eliminate potentially residual MPs. Plaque MPs content averaged  $183 \pm 17$  annexin V positive (AnnV<sup>+</sup>) MPs per  $\mu$ g lesion (n=62). Flow cytometric analysis of MPs is described in the Online Data Supplement. Unless otherwise stated, experiments using plaque MPs were performed at the concentration of 3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L for duration of 24 hours.

Circulating MPs were isolated from platelet-free plasma obtained by successive centrifugations of venous blood drawn from the same patients, as reported earlier.<sup>17</sup> Experiments on ICAM-1 expression were performed with pelleted circulating MPs and compared with the effect of platelet-free plasma devoid of MPs (obtained after 20 500g centrifugation and then filtered on 0.22- and 0.1- $\mu$ m filters; vehicle) (see the Online Data Supplement).

### Assessment of Adhesion Molecule Expression

Expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), human coronary artery endothelial cells (HCAECs), and COS-7 cells was determined by flow cytometry. Anti-human E-selectin-phycoerythrin (1  $\mu$ L/test), anti-ICAM-1-phycoerythrin-Cyanin5 (20  $\mu$ L/test) and anti-VCAM-1-phycoerythrin (4  $\mu$ L/test) antibodies, were all provided by BD Pharmingen (San Diego, CA). Details are provided in the Online Data Supplement.

Nonspecific protein synthesis inhibitors (cycloheximide, Sigma, St Louis, MO; actinomycin D, Sigma, St Louis, MO) were used. Inhibitors of the following pathways were also used: PI3-kinase (LY-294002; Sigma; St Louis, MO), NK- $\kappa$ B (pyrrolidine dithiocarbamate; Sigma; St Louis, MO), MAPKp42/44 pathway (PD 98059;

**Table 1. Patients Baseline Characteristics (n=62)**

Age (yrs)	72 (47–89)
Male gender, N (%)	52 (84)
Symptomatic plaques, N (%)	31 (50)
Stroke, N (%)	15 (24)
Transient ischemic attack, N (%)	10 (16)
Amaurosis, N (%)	6 (10)
Clinical features	
Diabetes, N (%)	13 (21)
Hypertension, N (%)	48 (77)
Smoking, N (%)	35 (59)
Dyslipidemia, N (%)	36 (58)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 (17.0–38.5)
Treatments	
Antiplatelet therapy, N (%)	56 (90)
Statins, N (%)	51 (82)
$\beta$ -blockers, N (%)	18 (29)
Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor antagonist, N (%)	34 (55)
Calcium channel blockers, N (%)	28 (45)
Diuretics, N (%)	21 (34)
Atherosclerotic plaque weight (mg)	735 (189–2200)

Data are expressed as median (range) or frequency (%).

Sigma; St Louis, MO), and PKC (Staurosporine [Sigma; St Louis, MO]; chelerythrine chloride [LC Laboratories, Woburn, MA], and Ro 31-8220 [Calbiochem; Nottingham; UK]). Fusion of MPs with endothelial cells was assessed by preincubating MPs with annexin V (3  $\mu$ g/mL; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 1 hour in appropriate buffer (140 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) in the presence of CaCl<sub>2</sub> (5 mmol/L). Control experiments were performed with the same level of buffer and calcium in the absence of annexin V.

We assessed neutralizing anti-human P-selectin antibody at a concentration of 1  $\mu$ g/mL (R&D Systems; Minneapolis, Minn), anti-human PSGL-1 antibody at a concentration of 50  $\mu$ g/mL (R&D Systems; Minneapolis, MN), and their corresponding isotypic control (respectively IgG<sub>1</sub>, R&D Systems; Minneapolis, MN; and IgM; Sigma, Jerusalem, Israel).

### Functional Integration of ICAM-1 in Target Cell Membrane

Confluent COS-7 cells plated in 6-well plates were incubated with MPs, or their vehicle (24 hours), washed, and then exposed to activating mouse anti-ICAM-1 antibody (AbDSerotec, Oxford, UK; 30 minutes) or its corresponding isotypic control. A sheep antimouse antibody (Amersham, GE healthcare) was used for cross-linking (15 minutes;<sup>18</sup>). COS-7 cells in DMEM supplemented or not with 10% FCS served as positive and negative controls, respectively. Proteins were separated by electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were first exposed to anti-P-ERK (Santa Cruz Biotechnology), and then to secondary antibody. After initial immunodetection, membranes were stripped and re-probed with anti-GAPDH antibody (Chemicon, Millipore, Billerica, MA). Details appear in the Online Data Supplement.

### Fluorescent Cell Preparation

Human polymorphonuclear (PMN) and U937 cells (details for isolation and culture are provided in the Online Data Supplement) were labeled with 0.5  $\mu$ mol/L fluorescent dye (CellTracker Orange CMTMR; Molecular Probes; Eugene, OR) as described previously.<sup>19</sup> Briefly, the cells were incubated with the fluorescent dye for 30

minutes, washed twice in RPMI and then resuspended in culture medium.

### Cell Adhesion Assay

HUVECs plated in 96-well plates were exposed for 24 hours to DMEM, plaque, or plasma MPs or 20500g supernatant. After washout using RPMI medium 1640, fluorescent U937 cells (5000/well) or phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-activated human PMN cells (2000/well) were allowed to adhere to HUVECs for 30 minutes. After 2 additional washouts, adherent monocytic cells were counted using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1).

In some experiments, HUVECs were exposed to neutralizing antibody targeting ICAM-1 or its corresponding isotypic control (IgG<sub>1</sub>; 10  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN) for 1 hour before the U937 cell adhesion protocol. U937 cells were pretreated or not with anti-LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) antibody (10  $\mu$ g/mL; Bender MedSystems, Vienna, Austria) or its corresponding isotypic control (IgG<sub>1</sub>) (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN).

### Cell Adhesion Assay Under Flow Condition

Confluent HUVECs plated in a parallel plate chamber were exposed to plaque MPs or 20500g supernatant. After 24 hours, the parallel plate chamber was connected to a syringe pump and fluorescent U937 cells (55/ $\mu$ L) were infused for 30 minutes at a controlled level of laminar low (1 dyn/cm<sup>2</sup>) or high (10 dyn/cm<sup>2</sup>) shear stress. During adhesion, the circuit was placed in a sterile 5% CO<sub>2</sub> incubator set at 37°C. After 2 washouts, adherent monocytic cells were counted under fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 inverted microscope).

### Organ Culture

C57BL/6 mouse left and right carotid arteries were isolated, cannulated at both extremities as described previously.<sup>19</sup> Plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L) were injected within the arterial lumen. After 24 hours, fluorescent U937 cells were injected in the lumen and allowed to interact for 30 minutes (5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL). Adherent cells were counted under a fluorescence microscope. More details appear in the Online Data Supplement.

### Transmigration Assays

Confluent HUVECs from the upper chamber of a transmigration assay were exposed to plaque MPs or 20500g supernatant (see the Online Data Supplement). After 24 hours, the medium of the upper chamber was removed and replaced by a medium containing 10<sup>6</sup> PMA-activated human PMN cells. After 24 hours, transmigrated cells in the lower chamber were numbered by flow cytometry analysis.

### Immunofluorescent and Scanning Electron Microscopy Analysis

Details regarding immunofluorescent and electron microscopy analysis appear in the Online Data Supplement. To test the hypothesis of a transfer of ICAM-1 from MPs to endothelial cells, plaque MPs were labeled with a primary mouse antihuman ICAM-1 antibody (unlabeled), washed twice, and incubated with HUVECs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L, corresponding to 30 AnnV<sup>+</sup> MPs/cell) for 24 hours. After washout, cells were incubated either with a fluorescent goat antimouse secondary antibody and analyzed under fluorescence microscope, or with gold-conjugated goat antimouse secondary antibody and analyzed with a scanning electron microscope.

To analyze the mechanism of interaction of MPs with endothelial cells, plaque MPs were incubated with a fluorescent dye, washed twice, and incubated with HUVECs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L). After 24 hours, HUVECs were incubated with primary mouse antihuman CD31 antibodies and then with donkey antimouse secondary antibodies conjugated to Cyanin5. After two more washouts with PBS, nuclei were stained with DAPI.

### Quantitative RT-PCR, Western Blotting, and ELISA

Details appear in the Online Data Supplement.

### Statistics

Data are presented as means $\pm$ SEM. Wilcoxon and Mann-Whitney tests were used respectively for paired and independent samples. All tests were 2-sided and used a significance level of 0.05. Data handling and analysis were performed with SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

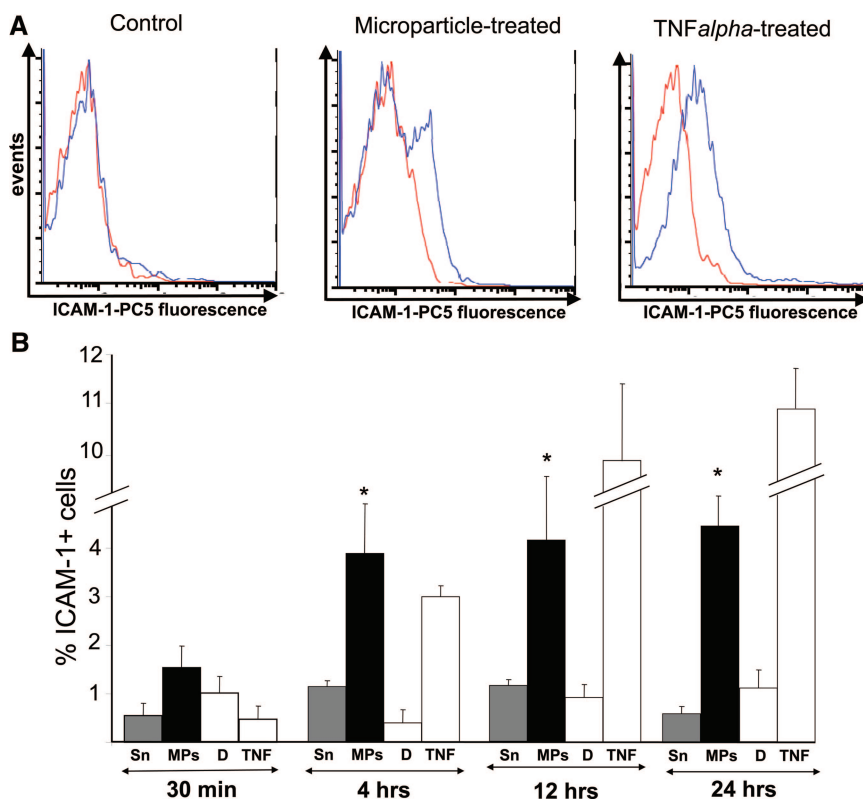
### Results

Endothelial cell exposure to plaque MPs augmented the levels of ICAM-1 in a time- and concentration-dependent manner (Figure 1). However, unlike TNF- $\alpha$ , plaque MPs did not affect endothelial expression of interleukin-8 mRNA (Online Figure I), endothelial release of interleukin-6, -8, monocyte chemoattractant protein-1 (Table 2) and endothelial expression of VCAM-1 or E-selectin (Online Table I). The effect of plaque MPs on endothelial ICAM-1 levels was already detectable at 30 minutes and was as potent as that induced by TNF- $\alpha$  after 4 hours exposure ( $P=0.47$ ; Figure 1B). After 24 hours of exposure, plaque MPs increased percentage of ICAM-1<sup>+</sup> cells by 3.4-fold when compared with the effect of the vehicle ( $P<0.001$ ; Figure 1B). This increase in ICAM-1<sup>+</sup> cells tended to be more robust for MPs obtained from symptomatic than asymptomatic patients, but did not reach statistical significance (4.8 $\pm$ 0.7 versus 3.9 $\pm$ 0.9% of ICAM-1<sup>+</sup> cells,  $n=25$  and 24, respectively;  $P=0.19$ ). A similar augmentation in ICAM-1 levels was observed for HAECs following exposure to plaque MPs (3.5 $\pm$ 1.3 versus 0.9 $\pm$ 0.1% of ICAM-1<sup>+</sup> HAECs for MP and vehicle treated cells, respectively;  $n=6$ ;  $P=0.03$ ). The effect of plaque MPs on endothelial ICAM-1 was not observed with circulating MPs obtained from the same patients, indicating that the augmented level of ICAM-1 is specific of MPs isolated from human atherosclerotic plaques (Online Figure II).

We then sought to evaluate the molecular mechanisms leading to the increase in endothelial ICAM-1 levels following exposure to plaque MPs. Quantitative RT-PCR experiments revealed that, if anything, plaque MPs decreased endothelial ICAM-1 mRNA expression after 6 hours exposure, whereas TNF- $\alpha$  significantly increased endothelial ICAM-1 mRNA expression (Figure 2A). No effect of plaque MPs on ICAM-1 mRNA expression was also observed after 24 hours exposure (data not shown). The effect of plaque MPs on ICAM-1 levels was not affected by actinomycin D or cycloheximide, whereas these agents significantly reduced ICAM-1 expression induced by TNF- $\alpha$  (data not shown). We also investigated pathways known to regulate ICAM-1 synthesis in endothelial cells and observed that inhibitors for PI3-kinase (LY-294002), NF $\kappa$ B (pyrrolidine dithiocarbamate), MAPK (PD 98059), and PKC (staurosporine, chelerythrine, and Ro 31-8220) pathways did not modify endothelial levels of ICAM-1 following plaque MPs exposure (data not shown). Collectively, these data suggest that the effect of plaque MPs on endothelial ICAM-1 does not result from either increased mRNA expression or protein synthesis.

Given the rapid increase in ICAM-1 (already detectable at 30 minutes), and the lack of effect of plaque MPs on ICAM-1





**Figure 1. Plaque MPs augment ICAM-1 levels on endothelial cells.** **A**, Representative flow cytometry fluorescence histogram showing the presence of ICAM-1 on endothelial cells exposed for 24 hours either to plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L) or TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). The red peak corresponds to negative control with isotopic antibody and the blue peak reflects ICAM-1-phycoerythrin-Cyanin5 (PC5) labeling of HUVECs. Control experiments were performed either with DMEM (D) or plaque supernatant (Sn), which gave the same results as DMEM on basal ICAM-1 levels. **B**, Exposure of HUVECs to plaque MPs or TNF- $\alpha$  augmented endothelial levels of ICAM-1 (flow cytometry analysis;  $n=8$  to 34 depending on the time points). \*A significant difference ( $P<0.05$ ) between MP and supernatant effects.

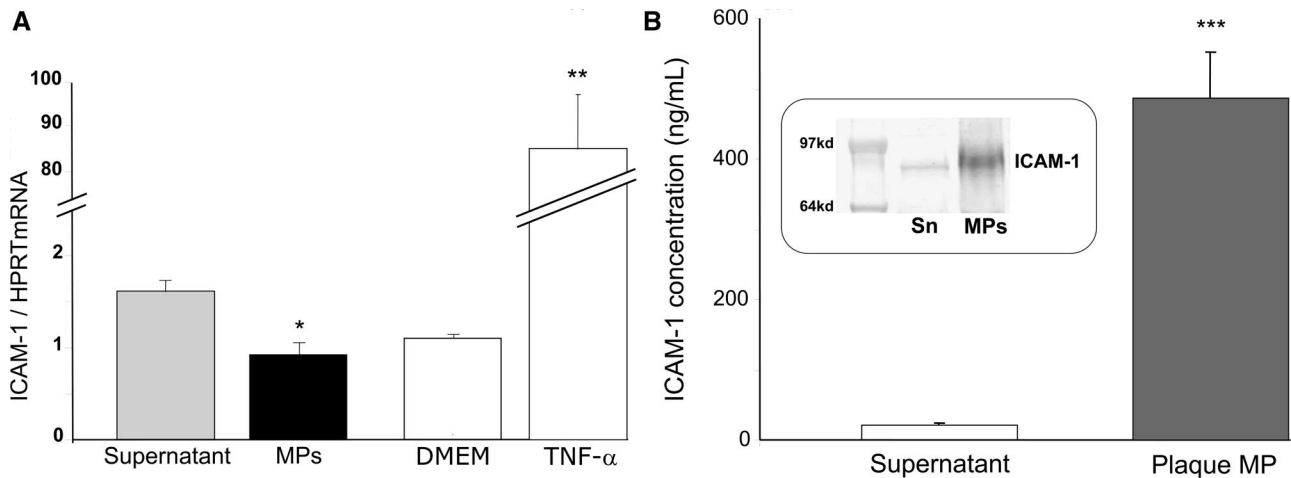
mRNA expression and protein synthesis, we tested the hypothesis that ICAM-1 transfers from MPs to endothelial cells. ELISA and Western blot analysis demonstrated the presence of substantial amount of ICAM-1 in plaque MPs (Figure 2B), but the absence of significant amounts of VCAM-1 or P-selectin (Online Table II). Unfortunately, ICAM-1 was only weakly detectable on plaque MPs using flow cytometry analysis ( $0.4\pm0.2\%$  of AnnV<sup>+</sup> MPs;  $n=22$ ), precluding to the determination of the cellular origin of ICAM-1+ MPs in the plaque. No significant difference in ICAM-1 level was detected between MPs from symptomatic and asymptomatic patients ( $327\pm231$  and  $245\pm235$  ng/mL respectively;  $P=0.25$ ;  $n=40$ ). To test the hypothesis that ICAM-1 transfers to endothelial cells, plaque MPs were labeled with a mouse anti-ICAM-1 antibody, washed twice to remove unbound antibody, and exposed to endothelial cells. Control experiments were performed with MP washing supernatant. Addition 24 hours later of a fluorescent antimouse secondary antibody revealed that incubation with ICAM-1-tagged MPs resulted in an intense ICAM-1 staining on the endothelial surface, whereas supernatant had no effect (Figure 3A). In a second set of experiments, the secondary antibody to ICAM-1 was gold-conjugated and scanning

electron microscopy analysis confirmed ICAM-1 presence at the endothelial surface (Figure 3B). Interestingly, the labeling was mostly observed in smooth areas of the endothelial cell surface. In a third set of experiments, MPs were labeled with the fluorescent dye CellTracker Green BODIPY to further assess the interaction between MPs and endothelial membrane. Confocal microscopy analysis demonstrated that CellTracker labeling colocalized with CD31 staining at the endothelial surface (Figure 3C). Furthermore, diffuse but significant CellTracker labeling was observed in the endothelial cytosol, attesting that some plaque MPs had fused with the endothelial membrane and delivered their fluorescent dye inside the cytoplasm (Figure 3C). Because plaque MPs are mostly of leukocyte origin,<sup>4</sup> we investigated whether the MP-endothelial interaction depended on P-selectin and PSGL-1.<sup>20</sup> PSGL-1 was detected by flow cytometry analysis on plaque MPs ( $14\pm12$  PSGL-1<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ g lesion;  $n=7$ ). However, neutralizing antibodies against PSGL-1 and P-selectin (incubated with MPs and endothelial cells respectively) did not affect endothelial ICAM-1 levels on exposure to MPs ( $n=4$ ; 24 hours; data not shown). As anionic phospholipids such as phosphatidylserine favor spontaneous fusion with cell membranes,<sup>21,22</sup> we then examined the effect

**Table 2. Effect of Plaque MPs on Cytokine Released by HUVECs**

	TNF- $\alpha$ (10 ng/mL)	DMEM	100 AnnV <sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L	1000 AnnV <sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L	3000 AnnV <sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L
Interleukin-6 (pg/mL)	1811 $\pm$ 670	58 $\pm$ 11	63 $\pm$ 7	65 $\pm$ 12	56 $\pm$ 10
Interleukin-8 (pg/mL)	15 028 $\pm$ 2 328	1458 $\pm$ 269	1439 $\pm$ 237	1478 $\pm$ 237	1250 $\pm$ 291
MCP-1 (pg/mL)	50 423 $\pm$ 10148	17 351 $\pm$ 3931	20 557 $\pm$ 5859	16 128 $\pm$ 4214	15 503 $\pm$ 4201

Unlike TNF- $\alpha$  (positive control), plaque MPs did not enhance the release of interleukin-6, -8, or monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) following 24 hours of stimulation of HUVECs ( $n=8$ ). Data are given as means $\pm$ SEM.



**Figure 2. Plaque MPs harbor ICAM-1, but do not stimulate endothelial ICAM-1 mRNA expression.** **A**, Quantitative RT-PCR analysis of endothelial ICAM-1 expression (6 hours;  $n=6$ ). As compared with plaque supernatant, MPs decreased ICAM-1 mRNA expression, whereas TNF- $\alpha$  increased ICAM-1 mRNA expression. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ . **B**, Presence of ICAM-1 in plaque MP pellet as compared with supernatant (ELISA assay;  $n=14$ ; \*\*\* $P<0.001$ ). **Inset**, Representative immunoblot (of 3 experiments) demonstrating the presence of ICAM-1 in plaque MPs.

of annexin V on ICAM-1 transfer to endothelial cells.<sup>20</sup> Preincubation of plaque MPs with annexin V (in the presence of 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ) decreased by  $69\pm 21\%$  endothelial ICAM-1 level resulting from plaque MP exposure ( $n=6$ ,  $P=0.03$ ; Figure 3D). To test whether the mechanisms of ICAM-1 transfer were specific for endothelial cells, we exposed COS-7 cells, known not to express ICAM-1,<sup>23</sup> with plaque MPs; this resulted in the presence of ICAM-1 antigenic reactivity at the surface of COS-7 cells (Figure 3E). We then examined whether or not MP-borne ICAM-1 was functionally integrated in the plasma membrane of COS-7 cells following exposure to plaque MPs (24 hours). An activating anti-ICAM-1 antibody increased ERK1/2 phosphorylation, a known downstream event in ICAM-1 mediated signal transduction<sup>24</sup> in COS-7 cells exposed to plaque MPs, but not to supernatant (vehicle) (Figure 3F). Collectively, these data demonstrate that MP-borne ICAM-1 is transferred and functionally integrated in target cell membranes.

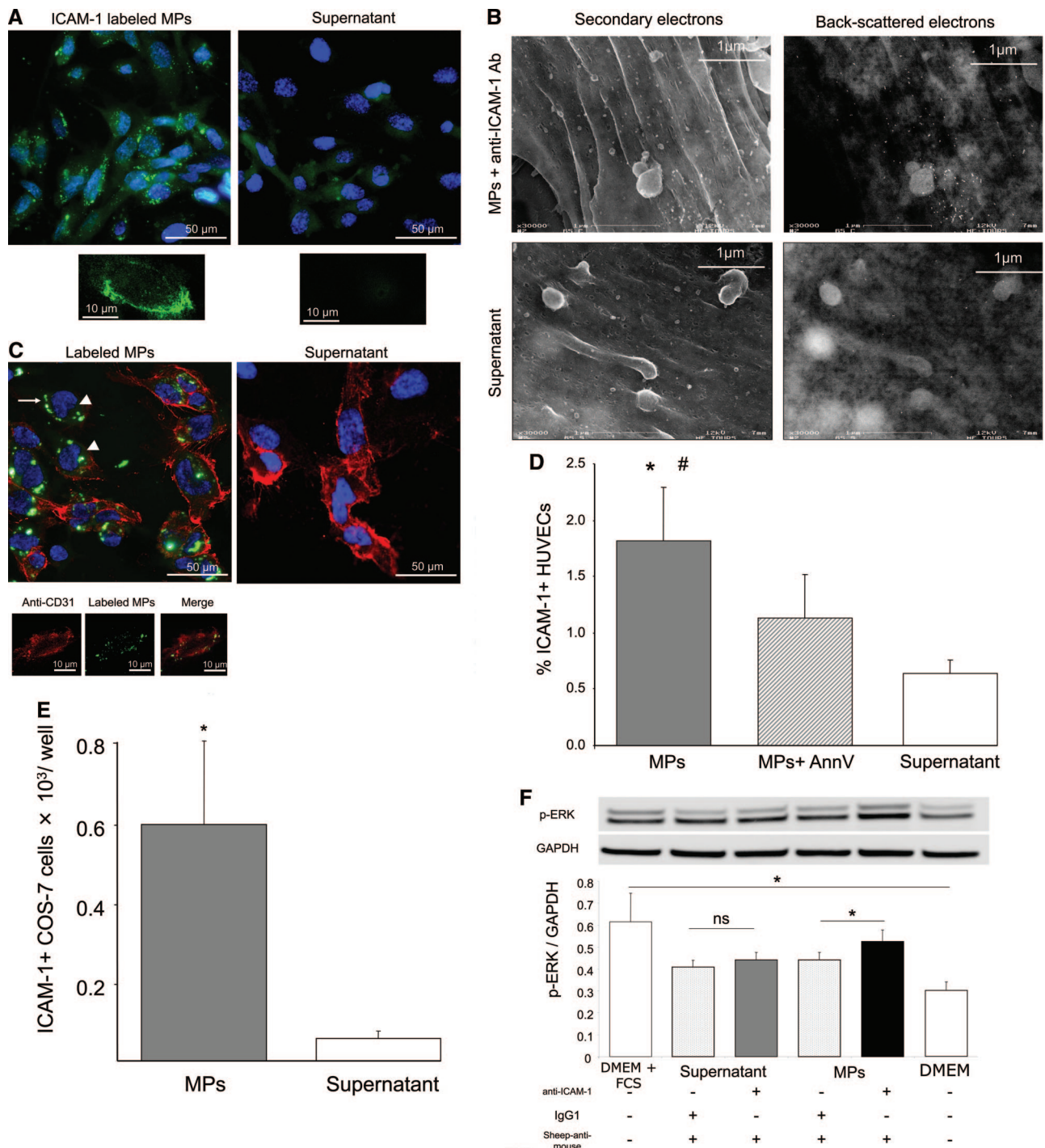
We next examined the potential functional consequences of the increased ICAM-1 levels attributable to plaque MPs. Exposure to plaque MPs (24 hours) enhanced in vitro adhesion of fluorescent U937 cells to HUVECs, when compared with DMEM or with MP vehicle-treated HUVECs (Figure 4A and 4B). Conversely, adhesion of fluorescent U937 cells to HUVECs was neither increased by circulating MPs at a concentration of 1000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu\text{L}$  (plasma MPs:  $9.1\pm 0.9$ ; plasma supernatant:  $8.1\pm 0.4$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $P=0.176$ ; 24 hours;  $n=7$ ) nor at a concentration of 3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu\text{L}$  (plasma MP:  $6.4\pm 1.7$ ; plasma supernatant:  $7.2\pm 1.8$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $P=0.345$ ; 24 hours;  $n=5$ ). Plaque MPs also increased the endothelial adhesion of human peripheral PMN cells ( $2.8\pm 0.6$  PMN cells/ $\text{mm}^2$ ;  $n=30$ ), as compared with DMEM ( $1.8\pm 0.2$  PMN cells/ $\text{mm}^2$ ;  $n=19$ ;  $P=0.007$ ) and with supernatant-treated HUVECs ( $1.75\pm 0.2$  PMN cells/ $\text{mm}^2$ ;  $n=30$ ;  $P=0.002$ ). The increase in endothelial adhesion of PMN cells was more pronounced for MPs obtained from symptomatic than asymptomatic patients (Figure 4C). The adhesion of U937 cells was decreased by  $58\pm 3\%$  using an

anti-LFA-1 neutralizing antibody, and by  $72\pm 2\%$  when combining anti-LFA-1 with anti-ICAM-1 antibodies (Figure 4D). The effect of plaque MPs on monocyte adhesion to endothelial cells persisted under low shear (plaque MP:  $4.1\pm 0.3$ ; supernatant:  $3.5\pm 0.3$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $P=0.043$ ; 3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu\text{L}$ ; 24 hours;  $n=5$ ) and high shear stress conditions (plaque MP:  $2.7\pm 0.2$ ; supernatant:  $2.0\pm 0.1$  cells/ $\text{mm}^2$ ;  $P=0.018$ ; 3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu\text{L}$ ; 24 hours;  $n=7$ ). Monocyte adhesion was also evaluated ex vivo in mouse carotid arteries maintained in organ culture at 80 mm Hg intraluminal pressure and exposed intraluminally to either plaque MPs or vehicle under static conditions for 24 hours. The number of adherent U937 cells was increased by 1.7 fold in vessels exposed plaque MPs, as compared with control conditions ( $P=0.02$ ;  $n=7$ ) (Figure 4E). Exposure of U937 cells to anti-LFA-1 and carotid artery to anti-ICAM-1 neutralizing antibodies decreased U937 cells adhesion to carotid artery by  $83\pm 11\%$  as compared with the corresponding isotypic IgGs controls ( $n=4$ ,  $P=0.039$ ) (Online Figure III). Thus, exposure of endothelial cells to plaque MPs favors monocytic cell adhesion both in vitro and ex vivo, under static and under flow conditions. Then, we sought to evaluate whether or not plaque MPs promote endothelial transmigration of PMN cells. Plaque MPs (24 hours) significantly increased PMN transmigration ( $n=16$ ;  $P=0.013$ ) and this effect was more robust for MPs isolated from symptomatic than asymptomatic patients ( $140\pm 34$  versus  $107\pm 19\%$  of vehicle effect;  $n=8$  each;  $P=0.04$ ).

## Discussion

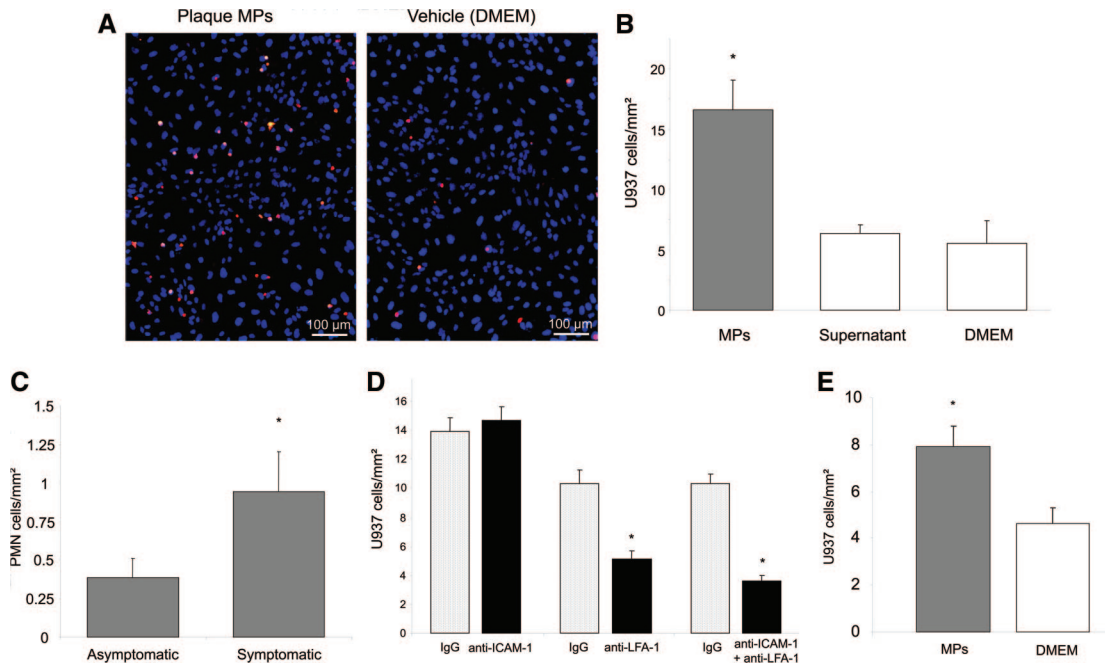
The present study demonstrates that ICAM-1 can transfer from human plaque MPs to endothelial cells, leading to increased leukocyte adhesion and transmigration. MPs originating from plaques may thus contribute to the progression and development of human atherosclerotic lesions.

We observe here that exposure to MPs isolated from human atherosclerotic plaques rapidly increases ICAM-1 at the endothelial cell surface, despite the lack of endothelial



**Figure 3. ICAM-1 transfer to target cells.** **A**, Plaque MPs were labeled with an anti-ICAM-1 antibody, washed to remove unbound antibody, and incubated with HUVECs for 24 hours (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L). Fluorescent secondary antibody was then applied, revealing an intense staining on the surface of endothelial cells incubated with MPs but not with washing supernatant. In the upper panels, nuclei are stained with DAPI (blue) (original magnification,  $\times 40$ ). These images are representative of 5 experiments. In the lower panels, confocal microscopy analysis confirmed the plasma membrane localization of the ICAM-1 staining (original magnification,  $\times 40$ ; representative of 3 experiments). In these experiments, plaque MPs, but not HUVECs, were incubated with the anti-ICAM-1 antibody. This explains why there is no staining for ICAM-1 on endothelial cell treated with “supernatant.” **B**, Plaque MPs were labeled with an anti-ICAM-1 antibody, washed to remove unbound antibody, and incubated with HUVECs for 24 hours (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L). Gold-conjugated secondary antibody was then applied, revealing by electron microscopy an intense staining on the surface of endothelial cells incubated with MPs but not with washing supernatant. **C**, Plaque MPs were labeled with the fluorescent CellTracker Green BODIPY dye (green), washed to remove unbound dye, and incubated with HUVECs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L). After 24 hours, fluorescent MPs colocalized with CD31 staining (red, arrow) but cytoplasm was also green (arrowhead), suggesting that at least a part of MPs had fused with cell plasma membrane. In the top images, nuclei are stained with DAPI (blue) (original magnification,  $\times 40$ ). These images are representative of 9 experiments. In the bottom images, confocal microscopy analysis confirmed the presence of MPs on the plasma membranes, as demonstrated by the colocalization of CD31 (red) and Cell-tracker labeled MPs (green) (original magnification,  $\times 40$ ; resolution 1  $\mu$ m). These images are representative of 3 experiments. **D**, Preincubation of plaque MPs with annexin V





**Figure 4. Adhesion assays.** **A**, Fluorescent U937 monocytic cells (orange) adhering to HUVECs exposed for 24 hours to either plaque MPs or DMEM in 96-wells plates (original magnification,  $\times 10$ ). Nuclei are stained with DAPI (blue). Representative of 7 experiments. **B**, As compared with DMEM or 20500g supernatant, exposure of HUVECs to plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L, for 24 hours) enhanced adhesion of U937 cells (5000/well;  $n=7$ ). **C**, Plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L) from symptomatic patients induced more adhesion of PMN cells (2000 PMN cells/well) to HUVECs than those from asymptomatic patients ( $n=30$ ;  $P=0.03$ ). Data are given as the difference in adherent PMN cell number per well between control conditions (MPs vehicle) and plaque MPs exposed cells. **D**, Exposure of U937 cells to anti-LFA-1 neutralizing antibodies decreased U937 cell adhesion to HUVECs previously incubated with plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L; 24 hours;  $n=4$ ). The combined exposure of U937 cells to anti-LFA-1 and HUVECs to anti-ICAM-1 antibodies further decreased this adhesion (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L, for 24 hours;  $n=4$ ). Control experiments were performed with the respective IgG isoforms (IgG). Data are means  $\pm$  SEM. **E**, Quantification of U937 cell adhesion ex vivo. Mouse arteries were incubated at 80 mm Hg for 24 hours with either plaque MPs or the 20 500g supernatant. Fluorescent U937 cells were then injected into the intraluminal space and left to adhere for 30 minutes; adherent cells were counted after washout. Monocytic cell adhesion was enhanced in vessels exposed to plaque MPs ( $n=7$ ). Data are given as means  $\pm$  SEM. \* $P<0.05$ .

ICAM-1 mRNA upregulation and that plaque MPs harbor measurable amounts of ICAM-1. As tagging MP ICAM-1 leads to the recovery of tagged ICAM-1 on endothelial cells, we hypothesized that ICAM-1 might be transferred from plaque MPs to endothelial membranes as the molecular link between exposure to MPs and increased monocyte adhesion. Such a transfer of protein from MPs to cells has been previously reported for instance for CXCR4 or CCR5.<sup>25–27</sup> Two types of interactions could contribute to this effect: docking of MPs on the endothelial surface involving a ligand-receptor interaction or fusion of their respective membranes.<sup>20</sup> Several findings support the interpretation that plaque MPs fuse with endothelial cell membranes: (1) high expression levels of fusogenic phospholipid phosphatidylserine on MPs, as attested to by intense annexin V labeling of plaque MPs<sup>4</sup>; (2) the inhibitory effect of annexin V on ICAM-1 endothelial levels following exposure to MPs; (3)

the delivery of a fluorescent dye contained in MPs to the endothelial cell cytoplasm; and (4) the transfer of ICAM-1 from MPs to smooth areas of the endothelial cell surface, as attested by electron microscopy data. Unlike the transfer of tissue factor from in vitro-generated leukocyte MPs to activated platelets,<sup>20</sup> the present study shows that the interaction between plaque MPs and nonactivated endothelial cells does not involve P-selectin and PSGL-1, but we cannot rule out the possibility that other ligand/receptor complexes could be involved. Furthermore, the increase in ICAM-1 levels observed in COS-7 cells, a cell line known not to express ICAM-1,<sup>23</sup> following MP exposure argues against the contribution of specific endothelial docking receptors and strongly favors the membrane fusion hypothesis. Interestingly, the effect of MPs on endothelial ICAM-1 appears to be specific for MPs isolated from human plaque, for an equivalent concentration of MPs isolated from the blood of the

**Figure 3 (Continued).** (3  $\mu$ g/mL) for 1 hour in the presence of CaCl<sub>2</sub> (5 mmol/L final concentration) decreased ICAM-1 levels as compared with the same levels of buffer and Calcium in absence of annexin V (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L; 24 hours;  $n=6$ ). Data are means  $\pm$  SEM. \*Indicates a significant difference ( $P<0.05$ ) between MP and Supernatant effects. #Indicates a significant difference ( $P<0.05$ ) between MPs and MPs incubated with annexin V effects. **E**, As compared with supernatant, exposure of COS-7 cells to plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L, for 24 hours;  $n=8$ ) leads to detectable ICAM-1 antigenic reactivity on COS-7 cells. COS-7 cells were mechanically scraped and incubated with anti-ICAM-1-phycoerythrin-Cyanin5 for flow cytometric analysis. \* $P<0.05$ . **F**, Functional integration of ICAM-1 in the plasma membrane of targeted cells. ICAM-1 crosslinking increase phosphorylation of ERK in COS-7 cells previously exposed for 24 hours to plaque MPs (3000 AnnV<sup>+</sup> MPs/ $\mu$ L;  $n=9$ ), but not in COS-7 cells exposed to supernatant. Data are means  $\pm$  SEM. \* $P<0.05$ ; ns, not significant.



same patients did not affect endothelial ICAM-1. Previous work from our group demonstrated that plaque MPs were of different cellular origins than their circulating counterparts and originated mostly from leukocytes.<sup>4</sup> The cellular origin of plaque MPs harboring ICAM-1 remains unclear, but leukocyte-derived or endothelial MPs present in human plaques could harbor ICAM-1 expressed by cells they stem from.<sup>28</sup> Furthermore, we observed that MP-borne ICAM-1 was functionally integrated in target cell membranes. This was associated with an augmented adhesion of U937 monocytes observed both in vitro and ex vivo and a stimulation of transendothelial migration of PMN cells. Anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 neutralizing antibodies inhibited U937 cell accumulation, thus demonstrating the contribution of ICAM-1 to this process. Interestingly, plaque MPs from symptomatic patients induced greater monocytic cell adhesion and transmigration than MPs from asymptomatic patients, suggesting a functional difference between these MPs. Although not statistically significant, the apparent greater abundance of phosphatidylserine<sup>4</sup> and of ICAM-1 (this study) in MPs isolated from symptomatic patients could contribute to an increased fusion and transfer of microparticle ICAM-1 to endothelial membrane, leading to a more robust functional effect than that of MPs from asymptomatic patients. However, the present study does not rule out the possibility that another adhesion mechanism could contribute the greater adhesion of monocyte to endothelial cells exposed to MP from symptomatic patients.

Several leukocyte adhesion molecules, including ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin, are expressed on vascular endothelial cells in human atherosclerotic plaques.<sup>2</sup> Furthermore, several studies have demonstrated the major implication of ICAM-1 in atherosclerosis through the regulation of monocyte recruitment into atherosclerosis-prone areas.<sup>2</sup> Indeed, ICAM-1 expression is elevated in atherosclerosis-prone aortas. Treatment of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice with anti-ICAM-1 antibodies reduced by 70% macrophage short-term homing into atherosclerotic lesions.<sup>29</sup> In addition, the absence of ICAM-1, CD18 (the  $\beta$ -subunit of LFA-1), or both reduced aortic lesion size, suggesting that ICAM-1 together with CD18 participates in the regulation of monocyte homing.<sup>30</sup> Together with the data presented here, these findings support the concept that plaque MPs, which accumulate in atherosclerotic lesions, may favor their development by enhancing the adhesion of monocytes and their transendothelial migration. However, the extent to which plaque MPs contribute to increased endothelial ICAM-1 expression in atherosclerotic lesions remains presently unknown as no general mechanism for MP formation has been demonstrated yet, thus precluding to the design of murine models of atherosclerosis where the formation of plaque MPs could be specifically prevented. Despite this limitation, the concomitant presence of MPs bearing ICAM-1 together with microvascular endothelial cells in advanced lesions let us speculate that plaque MPs could contribute in vivo to the increased ICAM-1 expression observed in atherosclerotic plaque. Indeed, given the existence within the plaque of abnormal microvessels characterized by disorganized branching and immature endothelial tubes with "leaky" imperfect linings, plaque MPs may diffuse within blood stream and thus transfer ICAM-1 to the endothelial cell

surface in a "paracrine" manner.<sup>31</sup> It should be highlighted that experiments of the present study were performed with MP concentrations lower than the estimated averaged MP abundance in lesions.<sup>4</sup> Alternatively, given the high concentration in MPs in the plaque (200-fold more concentrated than in the plasma from the same patients<sup>4</sup>), plaque MPs could increase systemic endothelial inflammation at the time of plaque rupture. They could also directly bind to Mac/LFA complexes in the circulation, therefore preventing leukocyte tethering and binding. However, both these potential effects in the circulation would likely be blunted by the high thrombogenic activity of plaque MPs.<sup>4,32</sup>

In conclusion, our results demonstrate that MPs isolated from human atherosclerotic plaques transfer ICAM-1 onto nonactivated endothelial cells to facilitate monocyte adhesion and transendothelial migration. Therefore, accumulation of MPs in atherosclerotic lesions may contribute to atherosclerotic plaque progression by stimulating the recruitment of inflammatory cells in the lesion.

### Acknowledgments

We acknowledge Bruno Esposito for excellent technical assistance, José Vilar for helpful discussions, Dr Brigitte Arbeille for electron microscopic analysis, Stéphanie Riou for advice regarding adhesion assays, and Emmanuelle Hoareau for Western blotting analysis.

### Sources of Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, an educational grant from Institut de Recherches Servier (Suresnes, France), the Leducq Foundation (LINK project), ANR-06-PHYSIO-038, Plan National de Recherche en Hépatogastroentérologie 2007 (A07146SP), Société Nationale Française de Gastroentérologie, Association Française d'Étude du Foie, and the European Vascular Genomics Network of Excellence (LSHM-CT-2003-503254; Brussels, B). P.E.R. was supported by the "poste d'accueil INSERM;" A.S.L. was supported by the "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur;" S.L. holds a Canada Research Chair in Cardiovascular Physiology, and C.M.B. was supported by "Contrat d'Interface Assistance Publique Hopitaux de Paris."

### Disclosures

None.

### References

1. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–1695.
2. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292–2301.
3. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1519–1522.
4. Leroy AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:772–777.
5. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999;99:348–353.
6. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:22–27.
7. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48:180–186.
8. Barry OP, FitzGerald GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemostasis*. 1999;82:794–800.
9. Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N. Oxidized membrane vesicles and blebs from

- apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:101–107.
10. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;158:277–287.
  11. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997;99:2118–2127.
  12. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102:136–144.
  13. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol.* 1998;161:4382–4387.
  14. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999;274:23111–23118.
  15. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Leseche G, Tedgui A, Bonardo B, Alessi MC, Boulanger CM, Nalbone G. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol.* 2007;171:1713–1723.
  16. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, Steele BM, Sullivan M, Falet H, Walsh MT, Barteneva N, Geng JG, Hartwig JH, Maguire PB, Wagner DD. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1019–1028.
  17. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:3381–3388.
  18. Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol.* 1999;162:2990–2996.
  19. Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van Haperen R, de Crom R, Tedgui A, Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res.* 2007;100:1226–1233.
  20. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106:1604–1611.
  21. Kinnunen PK, Holopainen JM. Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci Rep.* 2000;20:465–482.
  22. Burger KN. Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic.* 2000;1:605–613.
  23. Reischl A, Reithmayer M, Winsauer G, Moser R, Gosler I, Blaas D. Viral evolution toward change in receptor usage: adaptation of a major group human rhinovirus to grow in ICAM-1-negative cells. *J Virol.* 2001;75:9312–9319.
  24. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009;61:22–32.
  25. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, Ratajczak MZ. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS.* 2003;17:33–42.
  26. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V, Schlondorff D. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000;6:769–775.
  27. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Muller-Newen G, Soehnlein O, Weber C. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation.* 2010;122:495–506.
  28. van Buul JD, Kanter E, Hordijk PL. Endothelial signaling by Ig-like cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1870–1876.
  29. Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, Yeh ET. Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation.* 1998;97:75–81.
  30. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, Lin AH, Melchior EP, Bullard DC, Beaudet AL. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1517–1520.
  31. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2054–2061.
  32. Bonderman D, Teml A, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Gyongyosi M, Sperker W, Lass H, Mosgoeller W, Glogar DH, Probst P, Maurer G, Nemerson Y, Lang IM. Coronary no-reflow is caused by shedding of active tissue factor from dissected atherosclerotic plaque. *Blood.* 2002;99:2794–2800.

## Novelty and Significance

### What Is Known?

- Human atherosclerotic plaques contain large amounts of microparticles, which are submicron membrane vesicles released following cell activation or apoptosis.
- Plaque microparticles stimulate endothelial cell proliferation and new vessel formation in vivo, both of which contribute to making the plaque more fragile and increasing the chances of myocardial infarction or of stroke.

### What New Information Does This Article Contribute?

- We show here that plaque microparticles have an additional potentially deleterious effect by increasing the recruitment of monocytic inflammatory cells to atherosclerotic lesions.

- Microparticles are shown to harbor intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and transfer this adhesion molecule to the endothelial cell membrane, where it is functionally integrated.
- Transfer of ICAM-1 from microparticles to endothelial cells is shown to increase monocyte adhesion both in vitro, in isolated perfused mouse carotid and under flow condition. Microparticles also enhance migration of these cells through the endothelial barrier, thus contributing to inflammatory cell recruitment in atherosclerotic lesions.

Membrane-shed microparticles isolated from human atherosclerotic plaques transfer functional ICAM-1 to target endothelial cells, leading to increased monocyte adhesion and transmigration through the endothelial layer. Thus, microparticles accumulating in atherosclerotic plaques may contribute to lesion progression by enhancing inflammatory cells recruitment.

**SUPPLEMENTAL MATERIAL FOR:****Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1-dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration.**

Pierre-Emmanuel RAUTOU<sup>1,2</sup>, Aurélie S LEROYER<sup>1,2</sup>, Bhama RAMKHELAWON<sup>1,2</sup>, Cécile DEVUE<sup>1,2</sup>, Anne-Clémence VION<sup>1,2</sup>, Dominique DUFLAUT<sup>1,2</sup>, Gilles NALBONE<sup>3,4</sup>, Yves CASTIER<sup>1,2,5</sup>, Guy LESECHE<sup>5</sup>, Stéphanie LEHOUX<sup>1,6</sup>, Alain TEDGUI<sup>1,2</sup>, Chantal M BOULANGER<sup>1,2</sup>.

**DETAILED METHODS****MPs isolation from human endarterectomy specimens**

MPs were isolated from human atherosclerotic plaques according to a previously described procedure, which has been shown not to generate MPs from healthy human arteries<sup>1</sup>. MPs were characterized by flow cytometry using Annexin V labeling and their presence was confirmed by electron microscopy<sup>1</sup>.

Surgical samples were rapidly rinsed in cold sterile Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco BRL) supplemented with antibiotics (100 IU/mL Streptomycin, 100 IU/mL Penicillin and 10 µg/mL Polymyxin B; Sigma; St Louis, MO) and atherosclerotic lesions were separated from the apparently healthy vessel wall. In order to suspend MPs, plaques were then thoroughly minced using fine scissors in a volume of fresh DMEM, supplemented with antibiotics and filtered on 0.22 µm membrane, corresponding to 10 fold the respective weight of each lesion (100 mg tissue in 1 mL medium). The resulting preparations were centrifuged first at 400 g (15 min) and then at 12500 g (5 min) to remove cells and cell debris. The resulting supernatant (called "plaque homogenate") was subsequently used for flow cytometry experiments and further centrifuged at 20500 g for 150 minutes at 4°C to pellet MPs. All experiments were performed with pelleted MPs gently resuspended in fresh DMEM and compared to the effects either of DMEM alone or of the supernatant obtained after pelleting MPs from plaque homogenates and filtered successively on 0.22 µm and 0.1 µm membranes to completely eliminate MPs. The absence of effect of the procedure on healthy tissue was confirmed using freshly isolated rat aorta (n=4), for which 3±1 AnnV+ MPs/ µg tissue were retrieved, as compared with 183 ± 17 AnnV+ MPs/ µg lesion (n = 62) obtained from human atherosclerotic lesions in this study, and in accordance with previous reports<sup>1</sup>.

Plaque MP preparations were assayed for endotoxin contamination using Limulus lysate assay (QCL-1000, Cambrex, Lonza, Walkersville, MD): final endotoxin contamination was in all cases below detection limit, so that 3000 AnnV+ MPs/µL contained less than 5.2 ± 2.0 endotoxin units/mL (mean ± SEM).

**Circulating MP isolation**

Circulating MPs were isolated from platelet-free plasma obtained by successive centrifugations of venous blood drawn from the same patients, as reported earlier<sup>2</sup>. Briefly, citrated venous blood (5 mL) was centrifuged at 400 g for 15 min and then at 12500 g for 5 min at room temperature. In order to obtain, after dilution in endothelial cell medium, concentrations in MPs similar to those present in the plasma of the patients, circulating MPs were concentrated from platelet-free plasma using centrifugation at 20500 g for 150 minutes (+4°C) and resuspended in a volume of plasma corresponding to 1/10 of the initial volume of plasma remaining above the MP pellet.

**Flow cytometry analysis of MPs**

MPs were analyzed on a Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) as previously described<sup>1,2</sup>. A known amount of Flowcount calibrator beads (Beckman Coulter, Fullerton, CA; 20  $\mu$ L) was added to each sample just before performing flow cytometry analysis. Regions corresponding to MPs were identified in forward light scatter (FSC) and side-angle light scatter (SSC) intensity dot plot representation set at logarithmic gain. MP gate was defined, using calibration beads (Megamix, Biocytex, France and 0.1  $\mu$ m beads, Invitrogen, Eugene, OR), as events with a 0.1-1  $\mu$ m diameter and then plotted on a fluorescence/FSC fluorescence dot plot to determine MP counts positively labeled by specific antibodies. MP concentration was assessed by comparison to Flowcount calibrator beads. As previously described<sup>1</sup>, we incubated 10  $\mu$ L of plaque homogenate with anti-human P-Selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) phycoerythrin (20  $\mu$ L/test) or anti-ICAM-1- phycoerythrin-Cyanin5 (20  $\mu$ L/test) antibodies (BD Pharmingen; San Diego, CA) or their corresponding isotype-matched immunoglobulin G (IgG) controls at room temperature for 30 minutes in the dark. Presence of phosphatidylserine at the surface of plaque or plasma MPs was assessed using fluoroisothiocyanate-conjugated Annexin V (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) diluted in appropriate buffer (140 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in the presence or in the absence of  $\text{CaCl}_2$  (5 mmol/L), as a negative control<sup>2</sup>.

**Assessment of adhesion molecule expression**

Expression of adhesion molecules on endothelial cell was determined by flow cytometry. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and COS-7 cells were plated in 96-well plates and incubated at 37°C in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator. HUVECs (7 different donors) and HCAECs (1 donor) were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured respectively in endothelial cell basal medium supplemented with serum and growth factors and in endothelial cell growth medium (Heidelberg, Germany). All experiments were performed between passage 2 and 6. COS-7 cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Scotland, UK). When cells reached sub-confluence, they were stimulated with either MPs (20500 g pellet resuspended in fresh DMEM for plaque MPs or in filtered plasma supernatant for plasma MPs), their vehicle (20500 g supernatants), DMEM (as a negative control) or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Calbiochem, Nottingham, UK; 10 ng/mL, as a positive control) for 30 minutes, 4, 12, 24 and 48 hours. Thereafter, cell supernatant was replaced by phosphate buffer saline (PBS). Cells were mechanically scraped and incubated with the following fluorochrome-labelled antibodies or their corresponding isotype-matched IgG controls at room temperature for 30 minutes in the dark: anti-human E-Selectin-phycoerythrin (1  $\mu$ L/test), anti-ICAM-1- phycoerythrin-Cyanin5 (20  $\mu$ L/test) and anti-VCAM-1-phycoerythrin (4  $\mu$ L/test) antibodies, all provided by BD Pharmingen (San Diego, CA). HUVECs, HCAEC and COS-7 cells were analyzed on a Coulter EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) and numbered by comparison to Flowcount Calibrator beads of known concentration.

**Fluorescent Cell Preparation**

Peripheral venous blood (15–20 mL) was obtained from healthy volunteers by venopuncture and collected into heparinized, sterile, pyrogen-free tubes (BD Pharmingen, Grenoble, France). Blood was diluted 1:1 in PBS and monocytes were isolated by density-gradient centrifugation over endotoxin-free Ficoll–Paque (human Pancoll, Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). The cell layer containing polymorphonuclear (PMN) cells was collected and washed twice in PBS. The PMN cells were preactivated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 0.1  $\mu$ M; Sigma; St Louis, MO) for 30 minutes.



Cells of the human monocytic cell line U937 were cultivated in RPMI medium 1640 (Gibco BRL) containing antibiotics (100 IU/mL Streptomycin and 100 IU/mL Penicillin) and supplemented with 10% fetal calf serum.

### Organ Culture

C57BL/6 mice (17 weeks, Charles River, France) left and right carotid arteries were isolated, cannulated at both extremities, and immersed in an organ culture bath filled with DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 IU/mL Streptomycin, 100 IU/mL Penicillin and 10  $\mu$ g/mL Polymyxin B) as described previously<sup>3</sup>. Each arterial segment was connected to a closed perfusion circuit consisting of a 3-port reservoir and a pressure chamber allowing for the application of a controlled intraluminal hydrostatic pressure. Organ culture of carotid segments was performed under sterile conditions in an incubator set at 5% CO<sub>2</sub> and at 37°C. Vessels were exposed to a physiological pressure (80 mm Hg) for 24 hours. To avoid the potentially confounding effect of shear forces, no flow was applied. Plaque MPs (3000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L) were injected within the arterial lumen.

After 24 hours, fluorescent U937 cells were injected in the lumen of cultured vessels by the distal end, and allowed to interact for 30 minutes (5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL). After washout, vessels were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes. Adherent cells were counted under a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1). In some experiments, the lumen of cultured vessels were exposed to neutralizing antibody targeting ICAM-1 or its corresponding isotypic control (IgG<sub>1</sub>; 10  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN) for 1 hour before the U937 cells adhesion protocol. U937 cells were pretreated or not with anti-lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) antibody (10  $\mu$ g/mL; Bender MedSystems, Vienna, Austria) or its corresponding isotypic control (IgG<sub>1</sub>) (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN).

### Transmigration assays

HUVECs were seeded onto uncoated, low-density (8 $\times$ 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>), 3.0  $\mu$ m pore cell culture inserts which were placed in matching 24-well plates (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Upper and lower chambers contained 200  $\mu$ L and 700  $\mu$ L supplemented endothelial cell basal medium, respectively. After 7 days, confluent HUVECs from the upper chamber were exposed to plaque MPs or 20500g supernatant. After 24 hours, the medium of the upper chamber was removed and replaced by 200  $\mu$ L endothelial cell basal medium containing 10<sup>6</sup> PMA-activated human PMN cells. After 24 hours, transmigrated cells in the lower chamber were labeled with anti-human LFA-1-phycoerythrin (20  $\mu$ L/test) antibodies or their corresponding isotype-matched IgG controls (BD Pharmingen; San Diego, CA) and numbered by flow cytometry analysis (FACSCanto II flow cytometer; BD Biosciences, San Jose, CA) by comparison to Flowcount Calibrator beads of known concentration.

### Immunofluorescent analysis and scanning electron microscopy

In order to test the hypothesis of a transfer of ICAM-1 from MPs to endothelial cells, plaque MPs were incubated for 1 hour with a primary mouse anti-human ICAM-1 antibody (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN). Unbound antibody was removed by washing plaque MPs twice: MPs were resuspended in DMEM and further centrifuged at 20500 g for 150 minutes at 4°C to pellet MPs. MPs or supernatant of the second centrifugation (used as negative control) were incubated with HUVECs (3000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L, corresponding to 30 AnnV+ MPs/cell) for 24 hours.

In a first set of experiments, after washout with prewarmed PBS, HUVECs were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes. After one more washout with PBS and incubation with 5% bovine serum albumin, (Sigma; St Louis, MO) for 30 minutes, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with a 1:400 dilution of goat anti-mouse secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Invitrogen, Eugene, OR). After two more washouts, nuclei were

then stained with DAPI (blue). Immunofluorescence was detected using a 40× oil-immersion objective on a Zeiss Axio Imager Z1 microscope. Confocal microscopy was also performed (Bio-Rad MRC 600 confocal head with a Nikon microscope).

In another set of experiments, after washout with prewarmed PBS, HUVECs were pre-fixed in 2% paraformaldehyde for 10 minutes. The cells were then incubated for 1 hour at 37°C with a 1:30 dilution of gold-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (BBInternational, UK) diluted in PBS with 0.1% bovine serum albumin. The cells were then fixed with 85 mmol/L phosphate buffer pH 7.2 containing 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde. The preparations were post-fixed in 0.1% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol baths, dried to critical point using hexamethyldisilazane, and coated by platinum sputtering. They were examined with a Zeiss Gemini (Carl Zeiss, Le Pecq, France) scanning electron microscope.

In order to analyze the mechanism of interaction of MPs with endothelial cells, plaque MPs were incubated for 30 minutes with 20  $\mu$ M fluorescent dye (CellTracker Green BODIPY; Molecular Probes; Eugene, OR) at 37°C, washed twice by resuspending MPs in DMEM and centrifuging at 20500 g for 150 minutes at 4°C to pellet MPs. The amount of CellTracker+ MPs corresponded to  $62 \pm 8\%$  of AnnV+ MPs ( $n = 3$ ). MPs or supernatant of the second centrifugation (used as negative control) were incubated with HUVECs (3000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L). CellTracker Green BODIPY passes freely through cell membranes, but once inside the cytoplasm it is transformed into cell-impermeant reaction product<sup>4,5</sup>. After 24 hours, HUVECs were washed with prewarmed PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes. After one more washout with PBS and exposure to 5% bovine serum albumin for 30 minutes, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with primary mouse anti-human CD31 antibodies (1:50 dilution; BD Pharmingen; San Diego, CA). After two washouts with PBS, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with a 1:200 dilution of donkey anti-mouse secondary antibodies conjugated to Cyanin5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). After two more washouts with PBS, nuclei were stained with DAPI and analyzed under fluorescence (Zeiss Axio Imager Z1 microscope) and confocal (Bio-Rad MRC 600 confocal head with a Nikon microscope) microscopes.

### Quantitative RT-PCR

RT-PCR was performed to quantify ICAM-1 and IL-8 mRNA levels using the RNeasy micro protocol (Qiagen) to isolate total RNA from HUVECs exposed to MPs for 6 hours for IL-8 and 6 and 24 hours for ICAM-1. One microgram of RNA was mixed with random primers and reverse transcribed according to the first-strand method (Supershift, Invitrogen). cDNA thus obtained was amplified by PCR under the following conditions: 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 57.6°C, 30 seconds at 72°C, for 40 cycle s. PCR primers used were as follows: ICAM-1 sense, 5'-GCC CGA GCT CAA GTG TCT AAA GGA-3'; ICAM-1 antisense, 3'-TA GTA GTG ACA CCA TCG TCG GCG-5'; IL-8 sense 5' CAAGAGCCAGGAAGAAACCA 3' IL-8 antisense 5' GTCCACTCTCAATCACTCTCAG 3'; GAPDH sense, 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'; GAPDH antisense, 3'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-5'; HPRT sense, 5' GGGGGCTATAAATTCTTTGCTGACCT 3'; HPRT antisense, 5' TCGTGGGGTCCTTTTCACCAG 3'. The same cDNA samples were used for GAPDH, and ICAM-1 and for IL-8 and HPRT amplification. PCR amplification resulted in 485192 bp fragments originated from ICAM-1 mRNA, 225 bp from IL-8 mRNA, 226 bp from GAPDH mRNA and 303 bp from HPRT mRNA. For quantification, the number of PCR cycles was chosen within the linear exponential phase with respect to the amount of cDNA template and the PCR performed.

### ELISA assay

The medium of HUVECs exposed to plaque MPs for 12, 24 and 48 hours were removed and centrifuged at 500g for 15 min in order to eliminate cells debris. Interleukin-6, 8 and

monocyte chemoattractant protein-1 release were quantified with respectively Human interleukin-6, -8 and monocyte chemoattractant protein-1 ELISA kit provided by BD Pharmingen (San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. ICAM-1, VCAM-1 and P-Selectin exposed on MPs was also quantified by ELISA with Human sICAM-1 and sICAM-1 ELISA kit provided by BD Pharmingen (San Diego, CA) and Human soluble P-Selectin/CD62P Immunoassay (R&D Systems; Minneapolis, MN).

### **Assessment of the functional integration of ICAM-1**

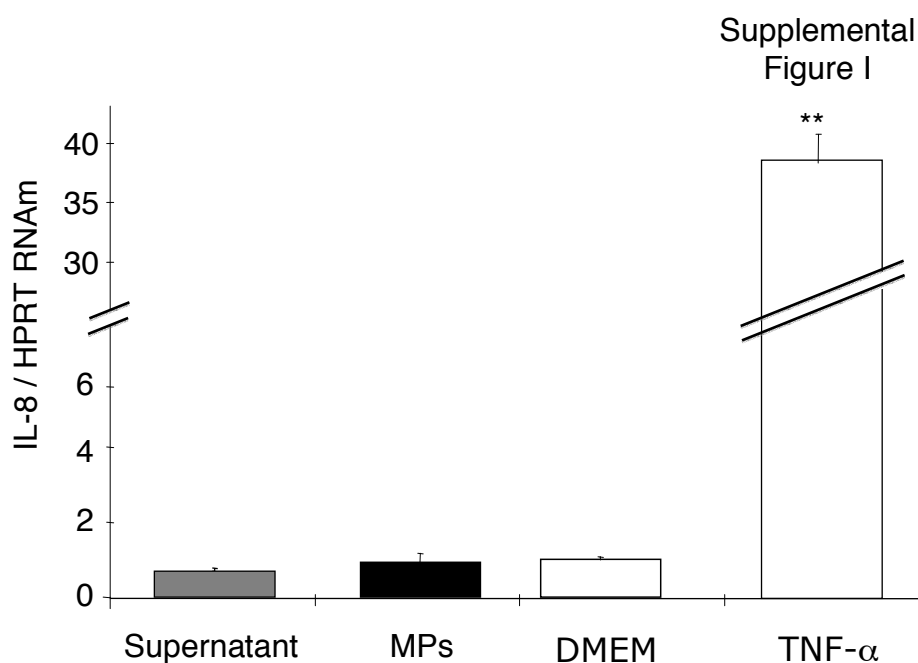
Confluent COS-7 cells plated in 6-well plates were incubated with MPs, or their vehicle (20500 g supernatant). After 24 hours, COS-7 cells were washed once, and then exposed for 30 minutes to activating mouse anti-human ICAM-1 antibody (clone 6.5B5; 5  $\mu$ g/mL; AbDSerotec, Oxford, UK) or its corresponding isotypic control (IgG<sub>1</sub>; 5  $\mu$ g/mL; R&D Systems; Minneapolis, MN). Cells were then washed twice and a sheep anti-mouse secondary antibody (Amersham, GE healthcare) was used for cross-linking at 1:1000 for 15 minutes<sup>6</sup>. As a negative control, confluent COS-7 cells were incubated with DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco, Scotland, UK). As a positive control, confluent COS-7 cells were incubated for 24 hours with DMEM without fetal calf serum, and then were exposed to 10% fetal calf serum for remaining 30 minutes (Gibco, Scotland, UK).

Finally, COS-7 cells were washed twice with cold PBS and scraped off in 50  $\mu$ L of RIPA buffer (150mM NaCl, 50mM TrisHCl pH7.4, 2mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% Sodium dodecyl sulfate, 2mM activated orthovanadate, complete protease inhibitor cocktail tablet and complete phosphatase inhibitor cocktail tablet (Roche, Neuilly-sur-seine, France)). Lysates were sonicated and protein content was quantified using the Lowry (Bio-Rad) protein assay. As detailed below, p-ERK level was then evaluated by western blot analysis.

### **Western blotting**

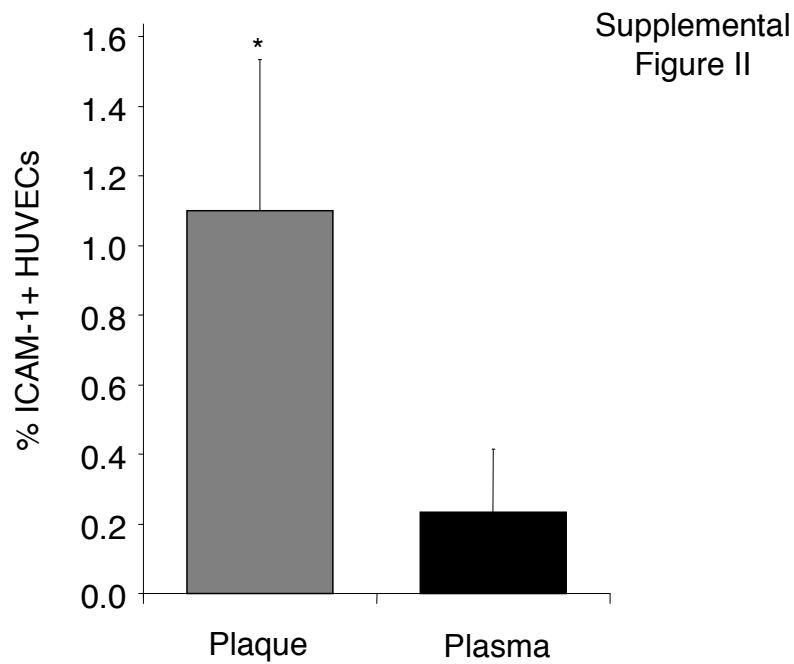
Detection of ICAM-1 on MPs pellet and 20500g supernatant was also performed by western blotting as previously described<sup>7</sup>. The same quantities of proteins (determined using the Bio-Rad protein determination assay) were submitted to electrophoresis on a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel (NuPAGE 10% acrylamide; Invitrogen). The anti-ICAM-1 antibody utilized (H-108) was from Santa-Cruz.

Detection of p-ERK in COS-7 cells was performed as follows. Lysates were mixed with the reducing sample buffer for electrophoresis and subsequent transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Equal loading (25 $\mu$ g) was verified using Ponceau red solution. Membranes were incubated with anti-P-ERK (1:1000, Santa Cruz, CA). After secondary antibody incubation (1:3000; Amersham, GE healthcare, UK), immunodetection proceeded using an enhanced chemiluminescence kit (Immun-Star WesternC kit, Bio-Rad, Hercules, CA) and bands were revealed using the Las-4000 imaging system and Image Gauge software (Fuji Film, Tokyo, Japan). After initial immunodetection, membranes were stripped of antibodies and reprobed with anti-GAPDH antibody (1:5000; Chemicon, Millipore, Billerica, MA).

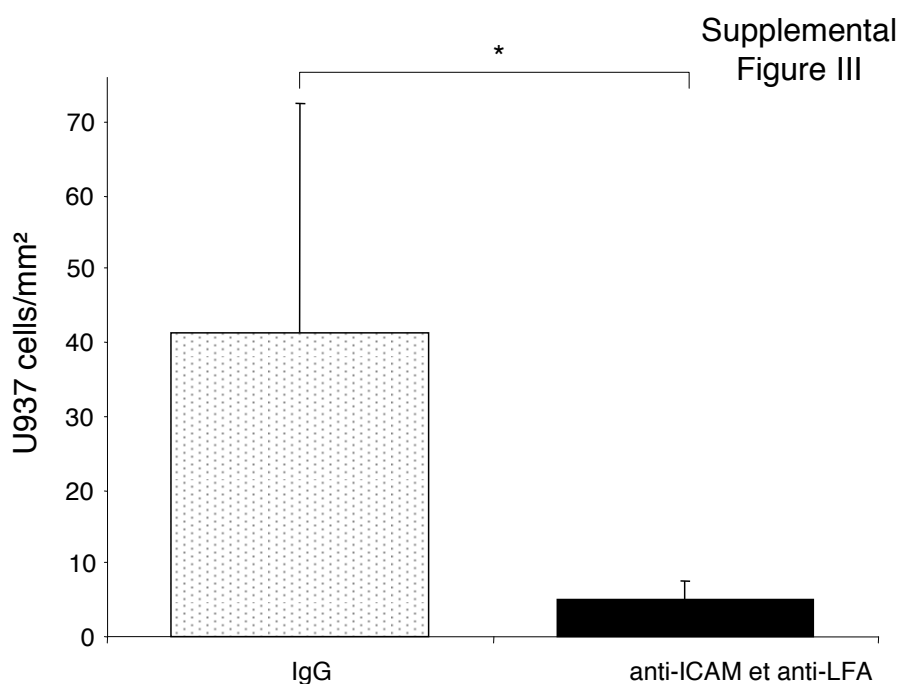
**SUPPLEMENTAL FIGURES and FIGURE LEGENDS**

**Supplemental Figure I.** Quantitative RT-PCR analysis of endothelial interleukin-8 mRNA expression (6 hours;  $n = 6$ ). Contrary to TNF- $\alpha$ , plaque MPs (3000 AnnV+MPs/ $\mu$ L) had no effect on interleukin-8 mRNA expression as compared both to plaque supernatant and to culture medium (DMEM). \*\*  $p < 0.01$ .





**Supplemental Figure II.** 24 hours exposure to plaque MPs induced greater ICAM-1 expression on HUVECs than that of circulating MPs from the same patients ( $n = 6$ ; 1000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L, which is in the range of the concentration observed in the plasma of these patients<sup>1</sup>). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .



**Supplemental Figure III.** Quantification of U937 cell adhesion *ex vivo*. Mouse arteries were incubated at 80 mmHg for 24 hours with plaque MPs (3000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L;  $n = 4$ ). Fluorescent U937 cells were then injected into the intraluminal space and left to adhere for 30 minutes; adherent cells were counted after washout. Exposure of U937 cells to anti-LFA-1 neutralizing antibodies and of carotid artery lumen to anti-ICAM-1 neutralizing antibodies decreased adhesion of U937 cells to carotid artery. Control experiments were performed with the respective IgG isotypes (IgG). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

**SUPPLEMENTAL TABLES**

**Supplemental Table I.** Exposure of HUVECs to plaque MPs did neither augment endothelial expression of VCAM-1 nor of E-selectin (flow cytometry analysis; n = 4; 24 hours).

	TNF- $\alpha$ (10 ng/mL)	DMEM	100 AnnV+ MPs/ $\mu$ L	1000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L	3000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L	6000 AnnV+ MPs/ $\mu$ L
% of VCAM-1 + HUVECs	10.2 $\pm$ 2.1	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0
% of E-selectin + HUVECs	14.2 $\pm$ 2.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Data are given as mean  $\pm$  SEM.

**Supplemental Table II.** Presence of VCAM-1 and P-Selectin on plaque MPs determined by ELISA in MP pellet and 20500 g supernatant (n = 14).

	MP pellet	20500 g supernatant	n =	p =
VCAM-1 (ng/mL)	7.47 $\pm$ 2.16	5.28 $\pm$ 1.5	5	0.225
P-selectin (ng/mL)	2.33 $\pm$ 0.35	1.86 $\pm$ 0.22	7	0.149

Data are given as mean  $\pm$  SEM.

**SUPPLEMENTAL REFERENCES**

1. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:772-777.
2. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:3381-3388.
3. Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, Ninio E, van Haperen R, de Crom R, Tedgui A, Lehoux S. High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res.* 2007;100:1226-1233.
4. Jaroszeski MJ, Gilbert R, Fallon PG, Heller R. Mechanically facilitated cell-cell electrofusion. *Biophys J.* 1994;67:1574-1581.
5. Jaroszeski MJ, Gilbert R, Heller R. Detection and quantitation of cell-cell electrofusion products by flow cytometry. *Anal Biochem.* 1994;216:271-275.
6. Lawson C, Ainsworth M, Yacoub M, Rose M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor-kappaB-independent mechanism. *J Immunol.* 1999;162:2990-2996.
7. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Leseche G, Tedgui A, Bonardo B, Alessi MC, Boulanger CM, Nalbone G. Microparticles of Human Atherosclerotic Plaques Enhance the Shedding of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme/ADAM17 Substrates, Tumor Necrosis Factor and Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *Am J Pathol.* 2007. 171:1713-23.

## **Discussion et perspectives**

L'ensemble de ces travaux permet de contribuer à la connaissance des mécanismes de génération des microparticules endothéliales (Articles 1 et 2).

Premièrement, l'étirement cyclique excessif a pour la première fois été identifié comme inducteur de la vésiculation endothéliale. Les caspases ont été identifiées comme effecteur principal de l'augmentation de ce taux de microparticules de manière indépendante de l'apoptose (Figure 45). En effet, l'étirement excessif n'augmente que faiblement le taux d'apoptose endothéliale <sup>37,240</sup> alors que le LPS, qui induit une très forte apoptose endothéliale sous étirement excessif, n'entraîne pas d'augmentation de la production de microparticules endothéliales dans notre modèle expérimental.

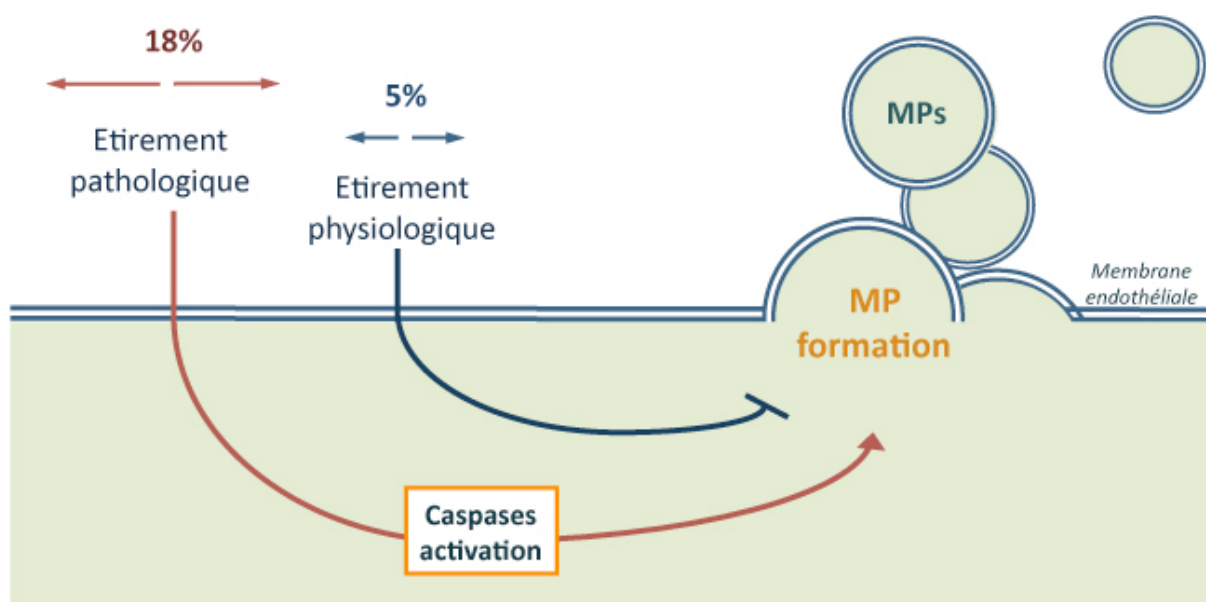


Figure 45 : Mécanisme d'action de l'étirement sur la production de microparticules endothéliales

La thrombine connue pour induire une perméabilité vasculaire importante sous étirement excessif par activation des Rho kinases, ne contribue pas à la production de microparticules endothéliales, de même que les Rho kinases, alors que ces éléments ont été décrits dans d'autres modèles comme de puissants activateurs de la vésiculation <sup>336</sup>. Deux hypothèses sont envisageables : cet effet est spécifique du modèle et du type cellulaire utilisé, ou alors des mécanismes compensatoires sont activés dans ces conditions, réprimant la voie de vésiculation activée classiquement par la thrombine. Dans les deux cas, nos résultats suggèrent qu'il existerait à la fois des mécanismes Rho-dépendants et Rho-indépendants, médiant l'effet des caspases sur le taux de microparticules endothéliales et activés dans des contextes différents.

Plusieurs points pourraient être approfondis dans cette première étude. Les effecteurs en amont et en aval des caspases restent encore inconnus. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induite par l'étirement cyclique <sup>433</sup> pourrait être envisagée comme un des activateurs des caspases. L'activité caspases joue également un rôle important dans l'organisation du cytosquelette. L'hypothèse d'une action sur la myosine semble exclue sachant qu'un inhibiteur des Rho-kinases n'a pas d'effet sur la production de microparticules mais les caspases sont aussi capables de cliver la filamine, élément identifié dans les microparticules de mégacaryocytes <sup>137</sup>. Le clivage de la filamine par les caspases conduisant à la déstabilisation de la structure du cytosquelette d'actine et favorisant le bourgeonnement est donc envisageable.

Le rôle de ces microparticules dans les pathologies associées à un étirement excessif reste encore à évaluer. On peut envisager que ces microparticules contribuent à la perméabilité endothéliale ou encore au recrutement leucocytaire, ces microparticules pourraient également avoir un effet délétère sur l'intégrité des alvéoles. Au niveau systémique, elles pourraient être impliquées dans la transmission de signaux aux organes distants. L'effet d'un étirement excessif pulmonaire pourrait être évalué *in vivo*, grâce à un model murin de VILI (« ventilatory induced lung injury »), sur le taux circulant de microparticules endothéliales, mais également sur le taux local contenu dans les poumons.

Deuxièmement, les faibles contraintes de cisaillement ont, elles aussi, été identifiées pour la première fois comme inducteur de la production de microparticules endothéliales. Cependant, elles mobilisent des effecteurs différents de ceux de l'étirement cyclique. Là encore, nos résultats montrent que l'apoptose ne participe pas au phénomène observé, et cette fois-ci les caspases ne sont pas non plus impliquées. Au contraire, sous faibles contraintes de cisaillement la production de microparticules est associée à deux mécanismes : le remodelage du cytosquelette induit par l'activation de RhoA - ROCK - ERK1/2, l'externalisation de la phosphatidylsérine par surexpression de scramblase1 et d'ABCA1. Les fortes contraintes de cisaillement vont être protectrices grâce à la production de NO, favorisant la présence d'actine polymérisée à la membrane plasmique et réprimant l'expression d'ABCA1 (Figure 46).

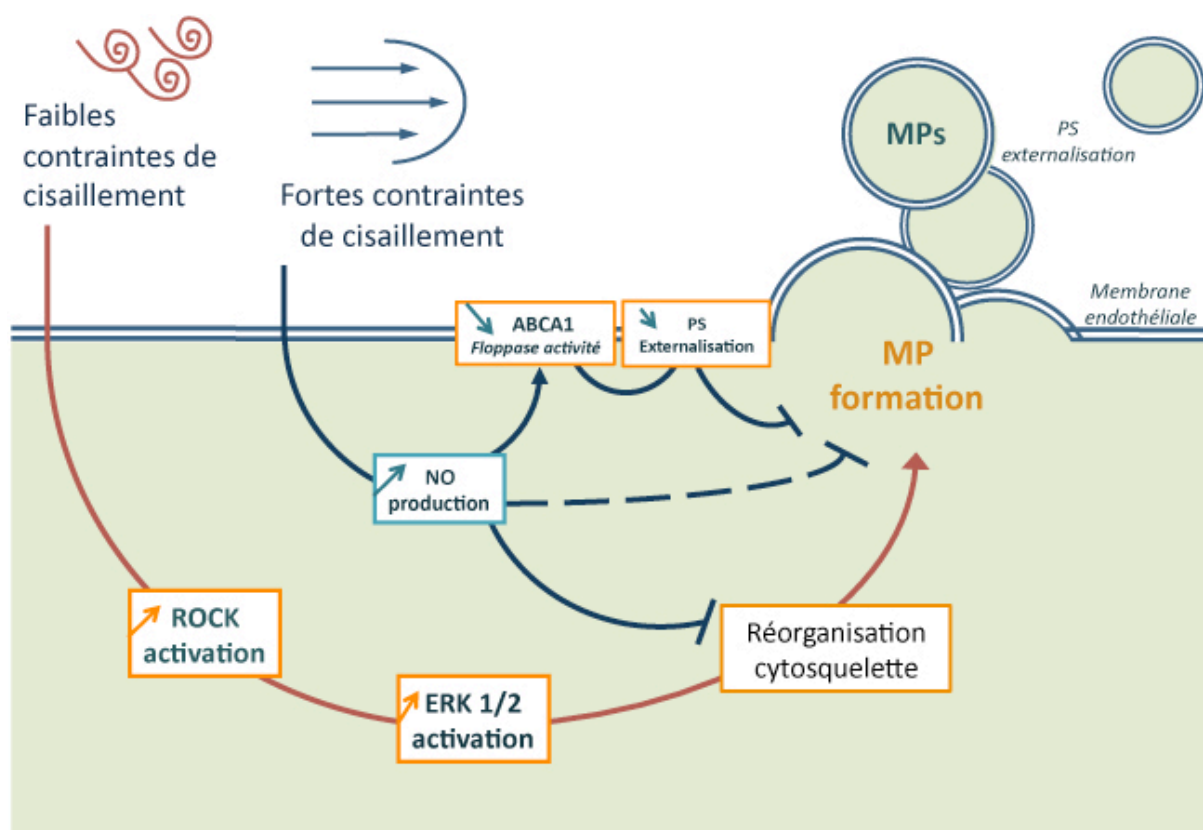


Figure 46 : Mécanismes d'action des contraintes de cisaillement sur la production de microparticules endothéliales

L'absence d'implication des caspases dans la production de microparticules pourrait être surprenante au vu de la littérature sur les stimuli apoptotiques et la production de microparticules endothéliales (déprivation, exposition à la camptothécine<sup>363</sup>). Cependant, l'induction de l'apoptose par les faibles contraintes de cisaillement est réelle mais reste modeste par rapport à d'autres stimuli, ce qui peut expliquer en partie que nous n'observions pas d'effet sur le taux de microparticules final, cette possibilité est soutenue par le fait que nous retrouvons très peu de corps apoptotiques sous faibles contraintes de cisaillement. Une autre hypothèse pourrait être que des voies compensatrices sont mises en jeu, masquant ainsi l'effet de l'inhibiteur de caspases dans notre modèle. Nous avons pu tester cette hypothèse par inhibition conjointe des caspases et de ROCK et nous n'avons démasqué aucun effet supplémentaire. La conclusion la plus probable dans notre cas est que l'apoptose ne contribue pas à la vésiculation endothéliale sous faibles contraintes de cisaillement; on se situe ici dans un contexte où la production des microparticules est due à l'activation endothéliale. La contribution de ROCK et ERK1/2 à la vésiculation renforce cette interprétation.



De manière intéressante, l'activation de la production de microparticules sous faibles contraintes de cisaillement passe par des effecteurs communs à ceux impliqués dans une stimulation par l'angiotensine ou la thrombine <sup>54,336</sup>. Sachant que les récepteurs de la thrombine et de l'angiotensine sont plus fortement exprimés sous faibles contraintes de cisaillement que sous fortes contraintes <sup>320</sup>, la question de l'effet d'une co-stimulation serait intéressante pour déterminer si, *in vivo*, ces stimuli sont « cumulables », entraînant ainsi une libération plus forte de microparticules, ou si au contraire ce taux serait maintenu à celui observé sous faibles contraintes de cisaillement.

*In vivo*, étirement et contraintes de cisaillement coexistent, il serait donc intéressant d'évaluer l'effet combiné de ces deux paramètres sur la production de microparticules endothéliales, d'autant plus que les effecteurs semblent être distincts.

Un autre point intéressant est la composante inflammatoire. L'étirement excessif tout comme les faibles contraintes de cisaillement sont souvent accompagnés, *in vivo*, d'une augmentation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Il a été clairement montré que la stimulation par le TNF $\alpha$  induit la production de microparticules endothéliales (et nous confirmons ces résultats avec l'IL1 $\beta$  également) par des mécanismes distincts de ceux impliqués sous faibles contraintes de cisaillement, faisant intervenir p38 et NF $\kappa$ B <sup>96</sup>. On peut donc raisonnablement envisager que ces mécanismes se cumulent, conduisant à un taux de microparticules encore augmenté.

L'identification d'ABCA1 comme régulateur de la production de microparticules *in vitro* corrobore l'observation faite chez des souris génétiquement déficientes en ABCA1 où le taux de microparticules Annexine V+ est fortement diminué <sup>93</sup> et approfondit ces résultats en montrant pour la première fois que les contraintes de cisaillement régulent l'expression de scramblase1 et ABCA1. En particulier, le mécanisme pour ABCA1 passe par la production de NO, inhibant la transcription d'ABCA1. Ces observations suggèrent que d'autres floppases, scramblases ou flippases pourraient elles aussi être régulées par les forces mécaniques.

L'identification du NO comme médiateur majeur de l'effet protecteur des fortes contraintes de cisaillement sur la vésiculation est très important. En effet, plusieurs études montrent que des patients présentant une dysfonction endothéliale ont des taux de microparticules endothéliales circulantes élevés et qui sont inversement corrélés à

l'amplitude de dilatation induite par le débit <sup>12,130,423</sup>. Sachant que vasodilatation et production de NO sont liés, nos résultats suggèrent qu'une moins bonne production (ou disponibilité) du NO de manière générale chez ces patients pourrait être directement responsable de l'augmentation du taux de microparticules endothéliales circulantes et ce quelque soit le facteur responsable de la baisse de la biodisponibilité du NO.

Cette hypothèse est soutenue par nos observations chez les patients où nous montrons pour la première fois que les forces hémodynamiques sont associées au taux de microparticules endothéliales présentes dans le plasma dans une population saine.

De manière plus générale, les microparticules circulantes ont été largement quantifiées dans diverses pathologies pour étudier leur valeur de biomarqueur et leur valeur pronostique. Ainsi, dans différentes pathologies cardiovasculaires leur taux, en particulier les taux de microparticules leucocytaires et endothéliales, sont associés à la sévérité de la pathologie <sup>12,77</sup>. Les microparticules endothéliales apparaissent comme un bon indicateur pronostique de la mortalité cardiovasculaire.

Ces études ont généralement été faites sur de petites cohortes de patients répondant à des critères très précis et ont été menées dans des laboratoires de recherche. Pour une utilisation clinique des microparticules comme biomarqueurs, il faudrait confirmer la valeur prédictive et évaluer leur impact sur la reclassification et la stratification des patients. Un autre point majeur pour une future utilisation en clinique est la standardisation de la préparation et de la mesure. En effet, la préparation des plasmas pour analyse et les méthodes de quantification sont encore très variables d'une étude à l'autre aujourd'hui. Les paramètres pré-analytiques sont également très importants pour ne pas générer de faux positifs. Il conviendrait donc de définir une méthode de préparation et d'analyse commune. En plus d'un intérêt pour la clinique, la standardisation de la mesure a un intérêt pour la recherche. Elle permettrait de pouvoir comparer des études menées dans des laboratoires différents et de mettre en place facilement des analyses multicentriques pour les études à très larges cohortes.

Sans tenir compte des limitations techniques actuelles, Il est également possible d'imaginer une approche des microparticules en tant que biomarqueur, non plus seulement en fonction de leurs origines mais également en fonction de leur contenu.

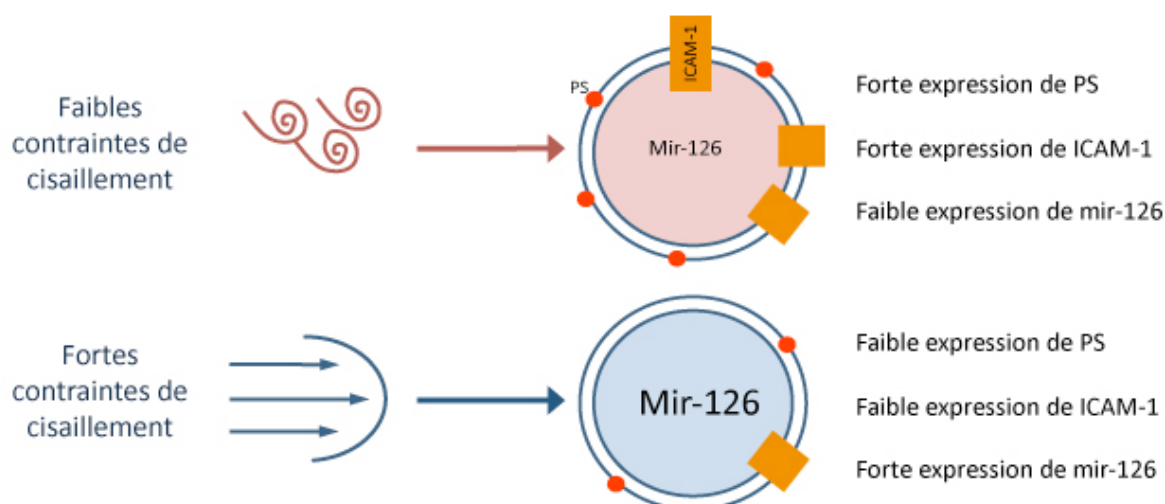
Certaines études abordent déjà ce point de manière indirecte par l'utilisation de marqueurs cellulaires variables pour un type cellulaire donné. Ainsi la valeur prédictive et les corrélations entre sévérité d'une pathologie et microparticules endothéliales sont fonction du marqueur utilisé : CD144+ pour l'issue des maladies coronariennes <sup>295</sup>, CD31+/CD41- pour la mort par accident cardiovasculaire dans une population d'insuffisants rénaux <sup>13</sup> ou CD62e+ pour l'hypertension pulmonaire <sup>14</sup>. sachant que ces marqueurs peuvent aussi être des molécules bio-actives, les augmentations des taux de ces types de microparticules en particulier peuvent être vues comme l'identification de microparticules endothéliales ayant des effets différents et donc un lien différent avec chaque pathologie.

L'information concernant le contenu serait en réalité double : Elle permettrait d'identifier l'effet biologique possible de ces microparticules dans la pathologie concernée mais surtout elle permettrait de connaître dans quel contexte ces microparticules ont été produites, si elles résultent d'une mort, d'une activation pro-inflammatoire, d'une prolifération ou d'une réparation tissulaire. Les microparticules donneraient ainsi accès aux modifications du tissu ciblé de manière complètement non invasive. Cela est particulièrement vrai pour les pathologies cardiovasculaires où les microparticules d'intérêt se retrouvent dans le sang circulant.

Mon travail de thèse s'insère dans cette thématique de connaissance du contenu microparticulaire car nous montrons que les contraintes de cisaillement influent sur la composition des microparticules (travaux 3 et 4).

Les faibles contraintes de cisaillement induisent une augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de phosphatidylsérine (Figure 47), suggérant ainsi un rôle de ces microparticules dans la thrombose et l'adhésion des cellules circulantes. Au laboratoire, des résultats préliminaires ont été obtenus concernant l'adhésion : L'incubation de cellules endothéliales avec les microparticules générées sous faibles contraintes augmente l'adhésion des monocytes en comparaison à l'incubation avec les microparticules générées sous fortes contraintes de cisaillement. Ceci corrobore les résultats obtenus avec les microparticules de plaque d'athérosclérose, reste à étudier le mode d'interaction et la manière dont ces microparticules augmentent le recrutement (transfert d'ICAM-1, augmentation de la synthèse protéique de diverses molécules d'adhésion ?).

La composition en microARN est également modulée (Figure 47). L’empaquetage important du miR-126 sous fortes contraintes de cisaillement suggère un rôle de ces microparticules dans la protection vasculaire contre l’apoptose <sup>445</sup> et potentiellement un rôle dans le contrôle de l’angiogenèse et de la progression tumorale.



**Figure 47: Composition des microparticules obtenues sous différentes contraintes de cisaillement**

Sachant que les mécanismes impliqués dans la production de microparticules endothéliales sont variables d’un stimulus à l’autre et que la composition des microparticules résultantes varie elle aussi avec ces stimuli, une hypothèse peut être émise quant à l’éventualité que les effecteurs de vésiculation et d’empaquetage soient communs. Par exemple, on peut envisager que les floppases responsables de la production de microparticules sous faibles contraintes de cisaillement soient aussi responsables de la quantité de phosphatidylsérine exposée à la surface des microparticules par la modulation directe de la quantité de phosphatidylsérine externalisée sur la cellule. On pourrait aussi envisager que ROCK participe à la localisation d’ICAM-1 sur les microparticules même si les mécanismes cellulaires semblent moins évidents.

En plus de la composition des microparticules, les résultats présentés dans cette thèse (Article 3) mettent en lumière un des effets des microparticules de plaque : l’augmentation du recrutement leucocytaire par transfert d’ICAM aux cellules cibles (Figure 48). Cet effet, dans le contexte de l’athérosclérose serait plutôt délétère, conduisant à une infiltration immunitaire accrue dans la plaque.

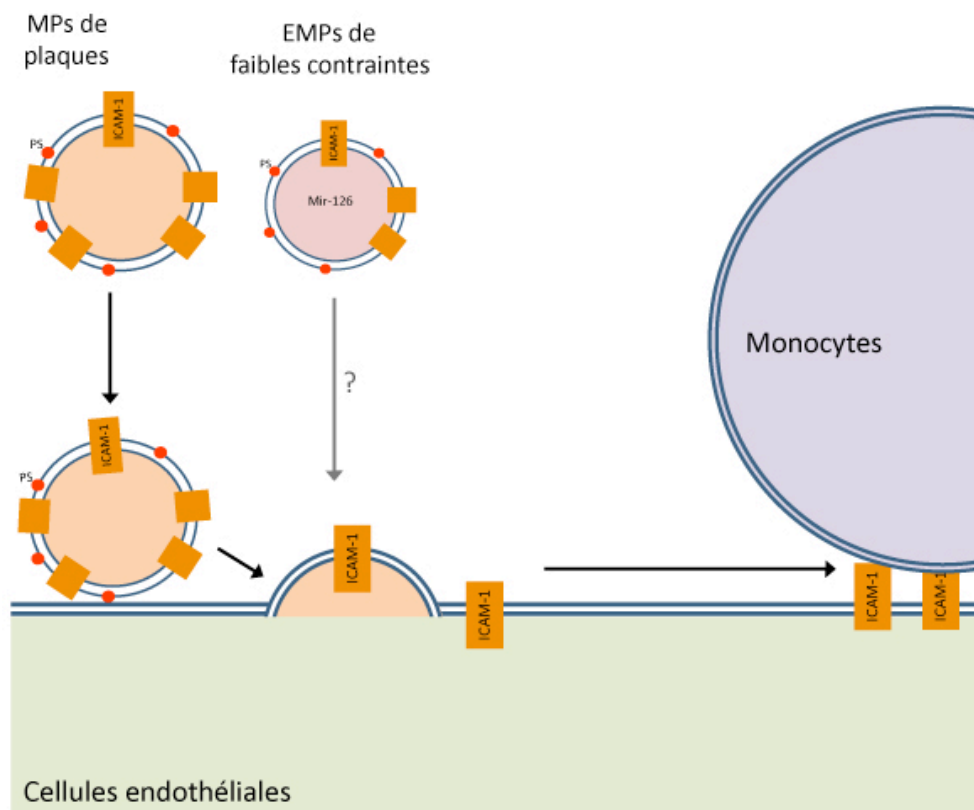


Figure 48 : Effet des microparticules de plaque sur le recrutement monocytaire

Les facteurs hémodynamiques ont été montrés comme facteurs importants dans l'adhésion monocytaire sous faibles contraintes de cisaillement. Ceci résulte de l'expression de molécules d'adhésion dans ces conditions, mais aussi des forces mécaniques qui s'appliquent permettant un contact prolongé entre cellule circulante et cellule endothéliale <sup>80</sup>. L'hypothèse que ces conditions favorisent l'interaction entre cellules endothéliales et microparticules endothéliales est donc plausible. Cela serait particulièrement intéressant car les microparticules sécrétées en plus grand nombre et portant davantage d'ICAM-1 et de phosphatidylsérine sous faibles contraintes de cisaillement pourraient avoir un effet paracrine et autocrine sur l'endothélium renforçant l'activation endothéliale dans ces zones. Au contraire, l'effet délétère de ces microparticules serait réduit au niveau des zones de fortes contraintes de cisaillement, les facteurs hémodynamiques n'étant pas propices à un contact durable entre microparticules et cellules endothéliales.

Comme présenté dans l'introduction, les effets de ces microparticules sont très divers et peuvent être bénéfiques comme délétères. Les microparticules endothéliales

possèdent un large répertoire de fonctions biologiques qui va dépendre de leur composition mais aussi de leur localisation. Ainsi des microparticules à caractère pro-angiogénique vont avoir des effets bénéfiques sur la revascularisation post-ischémique<sup>225</sup> mais délétères sur la stabilité de la plaque par augmentation du nombre de vasa-vasorum<sup>227</sup>, dans la progression du cancer ou dans la rétinopathie diabétique<sup>66</sup>. Autre exemple avec la coagulation où les microparticules endothéliales vont pouvoir avoir des effets fibrinolytiques ou au contraire pro-thrombotiques. Les microparticules endothéliales peuvent jouer un rôle dans l'inflammation là aussi avec des effets dichotomiques en fonction des molécules portées.

Les premiers travaux concernant les effets des microparticules endothéliales les ont principalement montrées comme des éléments nocifs de par leurs caractéristiques pro-inflammatoires, pro-coagulantes et inhibitrices de la réparation de l'endothélium. L'augmentation du taux de microparticules endothéliales circulantes dans de nombreuses pathologies soutient également un rôle négatif de ces microparticules endothéliales. Cependant, la littérature actuelle équilibre la balance en mettant en évidence de possibles effets bénéfiques des microparticules endothéliales dans l'intégrité endothéliale, notamment en stimulant la réparation vasculaire, en contrôlant les mécanismes de mort cellulaire ou les activités cytoprotectrices.

Les effets des microparticules ont été principalement démontrés *in vitro* ou *in vivo* en utilisant des microparticules générées *in vitro* ce qui permet de se poser une question essentielle : tous ces types de microparticules existent-ils *in vivo* ? Et ont-ils les effets biologiques attendus ?

Pour répondre à ces questions différents points doivent être approfondis. Premièrement, il est nécessaire d'augmenter notre connaissance des mécanismes contrôlant la vésiculation endothéliale et la libération des microparticules. Deuxièmement, une meilleure connaissance des mécanismes d'interaction et d'internalisation des microparticules par les cellules cibles est nécessaire pour agir sur certaines communications entre microparticules et cellules cibles. Troisièmement, il serait très intéressant de pouvoir posséder des modèles animaux pour mieux comprendre le rôle physiopathologique des microparticules par exemple avec des modèles de souris possédant un défaut d'externalisation de phosphatidylsérine dans certains types cellulaires ou encore n'exprimant pas certains récepteurs nécessaires à l'interaction cellule cible/microparticules. Enfin, manipuler la génération de

microparticules par approche pharmacologique *in vivo* semble être une stratégie prometteuse pour permettre de savoir si les microparticules sont bénéfiques ou délétères.

Ces résultats en lien avec l'ensemble de la littérature amènent à envisager les microparticules endothéliales comme une cible thérapeutique.

L'inhibition de voies spécifiques à la production de microparticules endothéliales pourrait permettre de réduire leurs effets négatifs sur l'activation endothéliale et sur la thrombose. De nombreux traitements actuels réduisent le taux de microparticules endothéliales circulantes comme la vitamine C ou certains inhibiteurs de canaux calciques <sup>270,291</sup>. Cependant, il est pour l'instant impossible de savoir si l'effet de ces traitements sur le taux de microparticules est une cause ou une conséquence de l'amélioration d'autres paramètres.

Les microparticules pourraient également être envisagées comme vecteurs thérapeutiques. En approche *in vivo*, des traitements activant la production de certains types de microparticules pourraient être envisagés dans le but d'augmenter leur effet bénéfique. Une autre stratégie pourrait consister à générer les microparticules *in vitro* grâce à des stimuli précis, permettant la création de microparticules au contenu connu qui seraient par la suite administrées au patient. Cette « ingénierie » des microparticules pourrait également permettre de cibler certains types cellulaires grâce à la présence de molécules spécifiques à la surface membranaire.

Bien sûr, ces suggestions restent à l'heure actuelle loin de pouvoir être mises en place. La connaissance des mécanismes de production des microparticules *in vivo* est encore insuffisante, de même que la composition de microparticules circulantes et leur réels effets biologiques *in vivo*. De plus, le ciblage des zones d'action des microparticules serait un déficit car une majorité des microparticules sont rapidement éliminées par le foie. A l'inverse, des stratégies visant le foie pourraient être prometteuses et plus simples à mettre en œuvre.

Aujourd'hui de nouvelles technologies de délivrance de médicaments *in vivo*, basées sur l'utilisation de liposomes ou de nanotechnologies (structure carbone, polymère) émergent. Ces outils semblent prometteurs et certainement plus simples à mettre en place que les stratégies à base de microparticules, mais ils ne pourraient être utilisés qu'en traitement aigu du fait de leur potentielle immunogénicité. L'avantage

des microparticules pourrait venir de leur biocompatibilité et du fait qu'elles ne délivrent pas un agent pharmaceutique mais une information biologique permettant une réponse physiologique de la cellule cible.

En conclusion, ce travail de thèse s'insère dans les grandes thématiques actuelles concernant les microparticules. Il répond à plusieurs interrogations sur la production de microparticules sous stimuli physiologiques et permet l'identification de nouvelles voies de signalisation responsables de la vésiculation. Les travaux concernant le contenu et les effets de ces microparticules sont encore à leurs prémices mais permettent déjà d'observer une dichotomie entre microparticules endothéliales produites en condition hémodynamiques favorables et microparticules produites en conditions défavorables.

Ces travaux seront utiles à court terme en venant enrichir les connaissances sur les microparticules endothéliales et à plus long terme pour l'utilisation des microparticules comme biomarqueur et valeur pronostique. Si les technologies futures le permettent, ils pourraient également être utiles en thérapeutique.



## **Bibliographie**

1. Abdel-Monem, H., Dasgupta, S.K., Le, A., Prakasam, A. & Thiagarajan, P. Phagocytosis of platelet microvesicles and beta2- glycoprotein I. *Thromb Haemost* **104**, 335-341 (2010).
2. Abdunour, R.E., Peng, X., Finigan, J.H., Han, E.J., Hasan, E.J., Birukov, K.G., Reddy, S.P., Watkins, J.E., 3rd, Kayyali, U.S., Garcia, J.G., Tudor, R.M. & Hassoun, P.M. Mechanical stress activates xanthine oxidoreductase through MAP kinase-dependent pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L345-353 (2006).
3. Abid Hussein, M.N., Boing, A.N., Biro, E., Hoek, F.J., Vogel, G.M., Meuleman, D.G., Sturk, A. & Nieuwland, R. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res* **121**, 865-871 (2008).
4. Abid Hussein, M.N., Boing, A.N., Sturk, A., Hau, C.M. & Nieuwland, R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* **98**, 1096-1107 (2007).
5. Abid Hussein, M.N., Meesters, E.W., Osmanovic, N., Romijn, F.P., Nieuwland, R. & Sturk, A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* **1**, 2434-2443 (2003).
6. Abid Hussein, M.N., Nieuwland, R., Hau, C.M., Evers, L.M., Meesters, E.W. & Sturk, A. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* **3**, 888-896 (2005).
7. Aharon, A., Tamari, T. & Brenner, B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* **100**, 878-885 (2008).
8. Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T. & Yoshida, Y. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res* **86**, 185-190 (2000).
9. Al Faraj, A., Gazeau, F., Wilhelm, C., Clément, O., Devue, C., Paradis, V., Boulanger, C. & Rautou, P.E. Endothelial cell-derived microvesicles loaded with iron oxide nanoparticles: feasibility of MRI monitoring in mice. *Radiology* **in press**(2012).
10. Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C. & Peter, M.E. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 721-726 (2002).
11. Ali, M.H., Pearlstein, D.P., Mathieu, C.E. & Schumacker, P.T. Mitochondrial requirement for endothelial responses to cyclic strain: implications for mechanotransduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L486-496 (2004).
12. Amabile, N., Guerin, A.P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., London, G.M., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3381-3388 (2005).
13. Amabile, N., Guerin, A.P., Tedgui, A., Boulanger, C.M. & London, G.M. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* (2011).
14. Amabile, N., Heiss, C., Chang, V., Angeli, F.S., Damon, L., Rame, E.J., McGlothlin, D., Grossman, W., De Marco, T. & Yeghiazarians, Y. Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant* **28**, 1081-1086 (2009).
15. Amabile, N., Rautou, P.E., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Hemost* **36**, 907-916 (2010).

16. Amabile, N., Renard, J.M., Caussin, C. & Boulanger, C.M. Circulating immune complexes do not affect microparticle flow cytometry analysis in acute coronary syndrome. *Blood* **119**, 2174-2175; author reply 2175-2176 (2012).
17. Angelot, F., Seilles, E., Biichle, S., Berda, Y., Gaugler, B., Plumas, J., Chaperot, L., Dignat-George, F., Tiberghien, P., Saas, P. & Garnache-Ottou, F. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* **94**, 1502-1512 (2009).
18. Antoniak, S., Boltzen, U., Eisenreich, A., Stellbaum, C., Poller, W., Schultheiss, H.P. & Rauch, U. Regulation of cardiomyocyte full-length tissue factor expression and microparticle release under inflammatory conditions in vitro. *J Thromb Haemost* **7**, 871-878 (2009).
19. Arnal, J.F., Dinh-Xuan, A.T., Pueyo, M., Darblade, B. & Rami, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1078-1087 (1999).
20. Auch-Schwelk, W., Katusic, Z.S. & Vanhoutte, P.M. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension* **15**, 699-703 (1990).
21. Augustin, H.G., Kozian, D.H. & Johnson, R.C. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16**, 901-906 (1994).
22. Barakat, A.I. Dragging along: the glycocalyx and vascular endothelial cell mechanotransduction. *Circ Res* **102**, 747-748 (2008).
23. Barakat, A.I., Leaver, E.V., Pappone, P.A. & Davies, P.F. A flow-activated chloride-selective membrane current in vascular endothelial cells. *Circ Res* **85**, 820-828 (1999).
24. Bardy, N., Karillon, G.J., Merval, R., Samuel, J.L. & Tedgui, A. Differential effects of pressure and flow on DNA and protein synthesis and on fibronectin expression by arteries in a novel organ culture system. *Circ Res* **77**, 684-694 (1995).
25. Barger, A.C., Beeuwkes, R., 3rd, Lainey, L.L. & Silverman, K.J. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* **310**, 175-177 (1984).
26. Barry, O.P., Pratico, D., Lawson, J.A. & FitzGerald, G.A. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* **99**, 2118-2127 (1997).
27. Barry, O.P., Pratico, D., Savani, R.C. & FitzGerald, G.A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**, 136-144 (1998).
28. Bastarache, J.A., Fremont, R.D., Kropiski, J.A., Bossert, F.R. & Ware, L.B. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1035-1041 (2009).
29. Bell, F.P., Adamson, I.L. & Schwartz, C.J. Aortic endothelial permeability to albumin: focal and regional patterns of uptake and transmural distribution of <sup>131</sup>I-albumin in the young pig. *Exp Mol Pathol* **20**, 57-68 (1974).
30. Bernimoulin, M., Waters, E.K., Foy, M., Steele, B.M., Sullivan, M., Falet, H., Walsh, M.T., Barteneva, N., Geng, J.G., Hartwig, J.H., Maguire, P.B. & Wagner, D.D. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost* **7**, 1019-1028 (2009).
31. Bevers, E.M., Wiedmer, T., Comfurius, P., Shattil, S.J., Weiss, H.J., Zwaal, R.F. & Sims, P.J. Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood* **79**, 380-388 (1992).

32. Bhullar, I.S., Li, Y.S., Miao, H., Zandi, E., Kim, M., Shyy, J.Y. & Chien, S. Fluid shear stress activation of IkappaB kinase is integrin-dependent. *J Biol Chem* **273**, 30544-30549 (1998).
33. Binnig, G., Quate, C.F. & Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930-933 (1986).
34. Bird, I.N., Taylor, V., Newton, J.P., Spragg, J.H., Simmons, D.L., Salmon, M. & Buckley, C.D. Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration. *J Cell Sci* **112 ( Pt 12)**, 1989-1997 (1999).
35. Birukov, K.G. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* **11**, 1651-1667 (2009).
36. Birukov, K.G., Birukova, A.A., Dudek, S.M., Verin, A.D., Crow, M.T., Zhan, X., DePaola, N. & Garcia, J.G. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 453-464 (2002).
37. Birukov, K.G., Jacobson, J.R., Flores, A.A., Ye, S.Q., Birukova, A.A., Verin, A.D. & Garcia, J.G. Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L785-797 (2003).
38. Birukov, K.G., Shirinsky, V.P., Stepanova, O.V., Tkachuk, V.A., Hahn, A.W., Resink, T.J. & Smirnov, V.N. Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* **144**, 131-139 (1995).
39. Birukova, A.A., Chatchavalvanich, S., Rios, A., Kawkitinarong, K., Garcia, J.G. & Birukov, K.G. Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol* **168**, 1749-1761 (2006).
40. Birukova, A.A., Fu, P., Xing, J., Yakubov, B., Cokic, I. & Birukov, K.G. Mechanotransduction by GEF-H1 as a novel mechanism of ventilator-induced vascular endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**, L837-848 (2010).
41. Blann, A.D., Steele, C. & McCollum, C.N. The influence of smoking and of oral and transdermal nicotine on blood pressure, and haematology and coagulation indices. *Thromb Haemost* **78**, 1093-1096 (1997).
42. Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J. & Lee, D.M. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583 (2010).
43. Boing, A.N., Hau, C.M., Sturk, A. & Nieuwland, R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* **19**, 96-103 (2008).
44. Boo, Y.C., Hwang, J., Sykes, M., Michell, B.J., Kemp, B.E., Lum, H. & Jo, H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1819-1828 (2002).
45. Boo, Y.C. & Jo, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C499-508 (2003).
46. Boulanger, C., Schini, V.B., Moncada, S. & Vanhoutte, P.M. Stimulation of cyclic GMP production in cultured endothelial cells of the pig by bradykinin, adenosine diphosphate, calcium ionophore A23187 and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **101**, 152-156 (1990).
47. Boulanger, C.M., Amabile, N., Guerin, A.P., Pannier, B., Leroyer, A.S., Mallat, C.N., Tedgui, A. & London, G.M. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* **49**, 902-908 (2007).

48. Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A. & Mallat, Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* **104**, 2649-2652 (2001).
49. Boullier, A., Bird, D.A., Chang, M.K., Dennis, E.A., Friedman, P., Gillotre-Taylor, K., Horkko, S., Palinski, W., Quehenberger, O., Shaw, P., Steinberg, D., Terpstra, V. & Witztum, J.L. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* **947**, 214-222; discussion 222-213 (2001).
50. Braunstein, E.M., White, S.J., Russell, W. & Harris, J.E. Paleoradiologic evaluation of the Egyptian royal mummies. *Skeletal Radiol* **17**, 348-352 (1988).
51. Brodsky, S.V., Malinowski, K., Golightly, M., Jesty, J. & Goligorsky, M.S. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation* **106**, 2372-2378 (2002).
52. Brown, G.T. & McIntyre, T.M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1beta-rich microparticles. *J Immunol* **186**, 5489-5496 (2011).
53. Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S. & Vane, J.R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**, 897-913 (1976).
54. Burger, D., Montezano, A.C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A. & Touyz, R.M. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1898-1907 (2011).
55. Busse, R. & Fleming, I. Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 24-29 (2003).
56. Butler, P.J., Tsou, T.C., Li, J.Y., Usami, S. & Chien, S. Rate sensitivity of shear-induced changes in the lateral diffusion of endothelial cell membrane lipids: a role for membrane perturbation in shear-induced MAPK activation. *FASEB J* **16**, 216-218 (2002).
57. Canault, M., Leroyer, A.S., Peiretti, F., Leseche, G., Tedgui, A., Bonardo, B., Alessi, M.C., Boulanger, C.M. & Nalbonte, G. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol* **171**, 1713-1723 (2007).
58. Carpintero, R., Gruaz, L., Brandt, K.J., Scanu, A., Faille, D., Combes, V., Grau, G.E. & Burger, D. HDL interfere with the binding of T cell microparticles to human monocytes to inhibit pro-inflammatory cytokine production. *PLoS One* **5**, e11869 (2010).
59. Cary, L.A. & Guan, J.L. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci* **4**, D102-113 (1999).
60. Casas, J.P., Bautista, L.E., Humphries, S.E. & Hingorani, A.D. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* **109**, 1359-1365 (2004).
61. Casscells, W., Naghavi, M. & Willerson, J.T. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease. *Circulation* **107**, 2072-2075 (2003).
62. Castro, A.F., Amorena, C., Muller, A., Ottaviano, G., Tellez-Inon, M.T. & Taquini, A.C. Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am J Physiol* **275**, C113-119 (1998).

63. Cauwenberghs, S., Feijge, M.A., Harper, A.G., Sage, S.O., Curvers, J. & Heemskerk, J.W. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* **580**, 5313-5320 (2006).
64. Cerri, C., Chimenti, D., Conti, I., Neri, T., Paggiaro, P. & Celi, A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* **177**, 1975-1980 (2006).
65. Chachisvilis, M., Zhang, Y.L. & Frangos, J.A. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15463-15468 (2006).
66. Chahed, S., Leroyer, A.S., Benzerroug, M., Gaucher, D., Georgescu, A., Picaud, S., Silvestre, J.S., Gaudric, A., Tedgui, A., Massin, P. & Boulanger, C.M. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* **59**, 694-701 (2010).
67. Chang, C.P., Zhao, J., Wiedmer, T. & Sims, P.J. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J Biol Chem* **268**, 7171-7178 (1993).
68. Chang, E. & Harley, C.B. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11190-11194 (1995).
69. Chang, Y.S., Yaccino, J.A., Lakshminarayanan, S., Frangos, J.A. & Tarbell, J.M. Shear-induced increase in hydraulic conductivity in endothelial cells is mediated by a nitric oxide-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 35-42 (2000).
70. Chappell, D.C., Varner, S.E., Nerem, R.M., Medford, R.M. & Alexander, R.W. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res* **82**, 532-539 (1998).
71. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* **166**, 189-197 (1946).
72. Chatzizisis, Y.S., Coskun, A.U., Jonas, M., Edelman, E.R., Feldman, C.L. & Stone, P.H. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* **49**, 2379-2393 (2007).
73. Chen, H.C. & Guan, J.L. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10148-10152 (1994).
74. Chen, K.D., Li, Y.S., Kim, M., Li, S., Yuan, S., Chien, S. & Shyy, J.Y. Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* **274**, 18393-18400 (1999).
75. Chen, Q., Li, W., Quan, Z. & Sumpio, B.E. Modulation of vascular smooth muscle cell alignment by cyclic strain is dependent on reactive oxygen species and P38 mitogen-activated protein kinase. *J Vasc Surg* **37**, 660-668 (2003).
76. Chien, S. Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall. *Prog Biophys Mol Biol* **83**, 131-151 (2003).
77. Chironi, G., Simon, A., Hugel, B., Del Pino, M., Gariépy, J., Freyssinet, J.M. & Tedgui, A. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2775-2780 (2006).
78. Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.M. & Tedgui, A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* **335**, 143-151 (2009).
79. Chironi, G.N., Simon, A., Boulanger, C.M., Dignat-George, F., Hugel, B., Megnien, J.L., Lefort, M., Freyssinet, J.M. & Tedgui, A. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens* **28**, 789-796 (2010).

80. Chiu, J.J., Chen, C.N., Lee, P.L., Yang, C.T., Chuang, H.S., Chien, S. & Usami, S. Analysis of the effect of disturbed flow on monocytic adhesion to endothelial cells. *J Biomech* **36**, 1883-1895 (2003).
81. Chiu, J.J., Chen, L.J., Chen, C.N., Lee, P.L. & Lee, C.I. A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *J Biomech* **37**, 531-539 (2004).
82. Chiu, J.J. & Chien, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* **91**, 327-387 (2011).
83. Chiu, J.J., Lee, P.L., Chang, S.F., Chen, L.J., Lee, C.I., Lin, K.M., Usami, S. & Chien, S. Shear stress regulates gene expression in vascular endothelial cells in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ : a study of the transcription profile with complementary DNA microarray. *J Biomed Sci* **12**, 481-502 (2005).
84. Chiu, J.J., Lee, P.L., Chen, C.N., Lee, C.I., Chang, S.F., Chen, L.J., Lien, S.C., Ko, Y.C., Usami, S. & Chien, S. Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[ $\alpha$ ] in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 73-79 (2004).
85. Chiu, J.J., Wang, D.L., Chien, S., Skalak, R. & Usami, S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *J Biomech Eng* **120**, 2-8 (1998).
86. Chou, J., Mackman, N., Merrill-Skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B.C. & Furie, B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* **104**, 3190-3197 (2004).
87. Chretien, M.L., Zhang, M., Jackson, M.R., Kapus, A. & Langille, B.L. Mechanotransduction by endothelial cells is locally generated, direction-dependent, and ligand-specific. *J Cell Physiol* **224**, 352-361 (2010).
88. Chuang, P.T., Cheng, H.J., Lin, S.J., Jan, K.M., Lee, M.M. & Chien, S. Macromolecular transport across arterial and venous endothelium in rats. Studies with Evans blue-albumin and horseradish peroxidase. *Arteriosclerosis* **10**, 188-197 (1990).
89. Clark, J.M. & Glagov, S. Luminal surface of distended arteries by scanning electron microscopy: eliminating configurational and technical artefacts. *Br J Exp Pathol* **57**, 129-135 (1976).
90. Clark, P.R., Jensen, T.J., Kluger, M.S., Morelock, M., Hanidu, A., Qi, Z., Tatake, R.J. & Pober, J.S. MEK5 is activated by shear stress, activates ERK5 and induces KLF4 to modulate TNF responses in human dermal microvascular endothelial cells. *Microcirculation* **18**, 102-117 (2011).
91. Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M.F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-345 (2001).
92. Collins, N.T., Cummins, P.M., Colgan, O.C., Ferguson, G., Birney, Y.A., Murphy, R.P., Meade, G. & Cahill, P.A. Cyclic strain-mediated regulation of vascular endothelial occludin and ZO-1: influence on intercellular tight junction assembly and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 62-68 (2006).
93. Combes, V., Coltel, N., Alibert, M., van Eck, M., Raymond, C., Juhan-Vague, I., Grau, G.E. & Chimini, G. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am J Pathol* **166**, 295-302 (2005).
94. Combes, V., Simon, A.C., Grau, G.E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F., Mutin, M., Sanmarco, M., Sampol, J. & Dignat-George, F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* **104**, 93-102 (1999).

95. Comfurius, P., Senden, J.M., Tilly, R.H., Schroit, A.J., Bevers, E.M. & Zwaal, R.F. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta* **1026**, 153-160 (1990).
96. Curtis, A.M., Wilkinson, P.F., Gui, M., Gales, T.L., Hu, E. & Edelberg, J.M. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost* **7**, 701-709 (2009).
97. Dachary-Prigent, J., Pasquet, J.M., Freyssinet, J.M. & Nurden, A.T. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca<sup>2+</sup>-ATPase inhibitors. *Biochemistry* **34**, 11625-11634 (1995).
98. Dale, G.L., Remenyi, G. & Friese, P. Tetraspanin CD9 is required for microparticle release from coated-platelets. *Platelets* **20**, 361-366 (2009).
99. Daleke, D.L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* **44**, 233-242 (2003).
100. Dalli, J., Norling, L.V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K.Y. & Perretti, M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* **112**, 2512-2519 (2008).
101. Dasgupta, S.K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R.V., Langlois, K., Nagata, S., Rumbaut, R.E. & Thiagarajan, P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* **113**, 1332-1339 (2009).
102. Dasgupta, S.K., Le, A., Chavakis, T., Rumbaut, R.E. & Thiagarajan, P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* **125**, 1664-1672 (2012).
103. Dashevsky, O., Varon, D. & Brill, A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer* **124**, 1773-1777 (2009).
104. Davies, P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**, 519-560 (1995).
105. Davies, P.F., Remuzzi, A., Gordon, E.J., Dewey, C.F., Jr. & Gimbrone, M.A., Jr. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2114-2117 (1986).
106. Davies, P.F., Robotewskyj, A. & Griem, M.L. Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *J Clin Invest* **93**, 2031-2038 (1994).
107. Davis, M.E., Grumbach, I.M., Fukai, T., Cutchins, A. & Harrison, D.G. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* **279**, 163-168 (2004).
108. De Keulenaer, G.W., Chappell, D.C., Ishizaka, N., Nerem, R.M., Alexander, R.W. & Griendling, K.K. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* **82**, 1094-1101 (1998).
109. Dekker, R.J., van Soest, S., Fontijn, R.D., Salamanca, S., de Groot, P.G., VanBavel, E., Pannekoek, H. & Horrevoets, A.J. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood* **100**, 1689-1698 (2002).
110. Dekker, R.J., van Thienen, J.V., Rohlena, J., de Jager, S.C., Elderkamp, Y.W., Seppen, J., de Vries, C.J., Biessen, E.A., van Berkel, T.J., Pannekoek, H. & Horrevoets, A.J. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* **167**, 609-618 (2005).



111. Del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P. & Lopez, J.A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604-1611 (2005).
112. dela Paz, N.G., Walshe, T.E., Leach, L.L., Saint-Geniez, M. & D'Amore, P.A. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *J Cell Sci* **125**, 831-843 (2012).
113. DeMaio, L., Chang, Y.S., Gardner, T.W., Tarbell, J.M. & Antonetti, D.A. Shear stress regulates occludin content and phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H105-113 (2001).
114. Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo Iacono, M., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B. & Camussi, G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* **110**, 2440-2448 (2007).
115. Devitt, A., Moffatt, O.D., Raykundalia, C., Capra, J.D., Simmons, D.L. & Gregory, C.D. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* **392**, 505-509 (1998).
116. Dewey, C.F., Jr., Bussolari, S.R., Gimbrone, M.A., Jr. & Davies, P.F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* **103**, 177-185 (1981).
117. Diamant, M., Tushuizen, M.E., Abid-Hussein, M.N., Hau, C.M., Boing, A.N., Sturk, A. & Nieuwland, R. Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Thromb Haemost* **100**, 489-497 (2008).
118. Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J.B. & Peter, K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* **93**, 633-644 (2012).
119. Dignat-George, F. & Boulanger, C.M. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 27-33 (2011).
120. Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J. & Zeiher, A.M. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* **83**, 334-341 (1998).
121. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. & Zeiher, A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* **185**, 601-607 (1997).
122. Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M. & Zeiher, A.M. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* **399**, 71-74 (1996).
123. Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J. & Zeiher, A.M. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 656-664 (1999).
124. Distler, J.H., Huber, L.C., Hueber, A.J., Reich, C.F., 3rd, Gay, S., Distler, O. & Pisetsky, D.S. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis* **10**, 731-741 (2005).
125. Donadee, C., Raat, N.J., Kanias, T., Tejero, J., Lee, J.S., Kelley, E.E., Zhao, X., Liu, C., Reynolds, H., Azarov, I., Frizzell, S., Meyer, E.M., Donnenberg, A.D., Qu, L., Triulzi, D., Kim-Shapiro, D.B. & Gladwin, M.T. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation* **124**, 465-476 (2011).
126. Doran, A.C., Meller, N. & McNamara, C.A. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 812-819 (2008).

127. Durante, W., Liao, L., Reyna, S.V., Peyton, K.J. & Schafer, A.I. Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle. *FASEB J* **14**, 1775-1783 (2000).
128. Eldh, M., Ekstrom, K., Valadi, H., Sjostrand, M., Olsson, B., Jernas, M. & Lotvall, J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One* **5**, e15353 (2010).
129. Esmon, C.T. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol* **131**, 417-430 (2005).
130. Esposito, K., Ciotola, M. & Giugliano, D. Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1926 (2006).
131. Essayagh, S., Brisset, A.C., Terrisse, A.D., Dupouy, D., Tellier, L., Navarro, C., Arnal, J.F. & Sie, P. Microparticles from apoptotic vascular smooth muscle cells induce endothelial dysfunction, a phenomenon prevented by beta3-integrin antagonists. *Thromb Haemost* **94**, 853-858 (2005).
132. Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A. & Henson, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90 (2000).
133. Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B.C. & Furie, B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* **197**, 1585-1598 (2003).
134. Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C., Sampol, J., Berland, Y., Brunet, P. & Dignat-George, F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* **4**, 566-573 (2006).
135. Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K. & Silverstein, R.L. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* **105**, 1049-1056 (2000).
136. Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. & Fleming, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* **168**, 81-88 (2000).
137. Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Richardson, J., Alden, E., Patel-Hett, S.R., Battinelli, E., Klement, G.L., Sola-Visner, M. & Italiano, J.E., Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* **113**, 1112-1121 (2009).
138. Fleming, I. & Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**, R1-12 (2003).
139. Florian, J.A., Kosky, J.R., Ainslie, K., Pang, Z., Dull, R.O. & Tarbell, J.M. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* **93**, e136-142 (2003).
140. Folkow, B. Myogenic mechanisms in the control of systemic resistance. Introduction and historical background. *J Hypertens Suppl* **7**, S1-4 (1989).
141. Fontana, V., Jy, W., Ahn, E.R., Dudkiewicz, P., Horstman, L.L., Duncan, R. & Ahn, Y.S. Increased procoagulant cell-derived microparticles (C-MP) in splenectomized patients with ITP. *Thromb Res* **122**, 599-603 (2008).
142. Frank, J.A. & Matthay, M.A. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* **7**, 233-241 (2003).

143. Freed, J.K. & Greene, A.S. Proteomic analysis of shear stress-mediated protection from TNF-alpha in endothelial cells. *Microcirculation* **17**, 259-270 (2010).
144. Freikman, I., Amer, J., Cohen, J.S., Ringel, I. & Fibach, E. Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes--an NMR study. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 2388-2394 (2008).
145. Freyssinet, J.M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* **1**, 1655-1662 (2003).
146. Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376 (1980).
147. Gabriels, J.E. & Paul, D.L. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res* **83**, 636-643 (1998).
148. Galbraith, C.G., Skalak, R. & Chien, S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**, 317-330 (1998).
149. Gambim, M.H., do Carmo Ade, O., Marti, L., Verissimo-Filho, S., Lopes, L.R. & Janiszewski, M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care* **11**, R107 (2007).
150. Gasser, O. & Schifferli, J.A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* **104**, 2543-2548 (2004).
151. Gauley, J. & Pisetsky, D.S. The release of microparticles by RAW 264.7 macrophage cells stimulated with TLR ligands. *J Leukoc Biol* **87**, 1115-1123 (2010).
152. Gautam, M., Shen, Y., Thirkill, T.L., Douglas, G.C. & Barakat, A.I. Flow-activated chloride channels in vascular endothelium. Shear stress sensitivity, desensitization dynamics, and physiological implications. *J Biol Chem* **281**, 36492-36500 (2006).
153. Gerrits, A.J., Koekman, C.A., Yildirim, C., Nieuwland, R. & Akkerman, J.W. Insulin inhibits tissue factor expression in monocytes. *J Thromb Haemost* **7**, 198-205 (2009).
154. Gimbrone, M.A., Jr., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R. & Garcia-Cardena, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 230-239; discussion 239-240 (2000).
155. Gluais, P., Lonchamp, M., Morrow, J.D., Vanhoutte, P.M. & Feletou, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* **146**, 834-845 (2005).
156. Go, Y.M., Boo, Y.C., Park, H., Maland, M.C., Patel, R., Pritchard, K.A., Jr., Fujio, Y., Walsh, K., Darley-Usmar, V. & Jo, H. Protein kinase B/Akt activates c-Jun NH(2)-terminal kinase by increasing NO production in response to shear stress. *J Appl Physiol* **91**, 1574-1581 (2001).
157. Go, Y.M., Park, H., Maland, M.C., Darley-Usmar, V.M., Stoyanov, B., Wetzker, R. & Jo, H. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol* **275**, H1898-1904 (1998).
158. Gojova, A. & Barakat, A.I. Vascular endothelial wound closure under shear stress: role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels. *J Appl Physiol* **98**, 2355-2362 (2005).
159. Goldfinger, L.E., Tzima, E., Stockton, R., Kiosses, W.B., Kinbara, K., Tkachenko, E., Gutierrez, E., Groisman, A., Nguyen, P., Chien, S. & Ginsberg, M.H. Localized alpha4 integrin phosphorylation directs shear stress-induced endothelial cell alignment. *Circ Res* **103**, 177-185 (2008).
160. Gooch, K.J., Dangler, C.A. & Frangos, J.A. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* **171**, 252-258 (1997).

161. Gouverneur, M., Spaan, J.A., Pannekoek, H., Fontijn, R.D. & Vink, H. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H458-452 (2006).
162. Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R. & Hazen, S.L. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* **203**, 2613-2625 (2006).
163. Grundmann, S., Schirmer, S.H., Hekking, L.H., Post, J.A., Ionita, M.G., de Groot, D., van Royen, N., van den Berg, B., Vink, H., Moser, M., Bode, C., de Kleijn, D., Pasterkamp, G., Piek, J.J. & Hoefer, I.E. Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in growing collateral arteries and modulate leucocyte adhesion in arteriogenesis. *J Cell Mol Med* **13**, 3463-3474 (2009).
164. Gudi, S., Huvar, I., White, C.R., McKnight, N.L., Dusserre, N., Boss, G.R. & Frangos, J.A. Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by G $\alpha$ (q) and G $\beta$ tagamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 994-1000 (2003).
165. Gudi, S.R., Clark, C.B. & Frangos, J.A. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res* **79**, 834-839 (1996).
166. Guo, D., Chien, S. & Shyy, J.Y. Regulation of endothelial cell cycle by laminar versus oscillatory flow: distinct modes of interactions of AMP-activated protein kinase and Akt pathways. *Circ Res* **100**, 564-571 (2007).
167. Gyorgy, B., Modos, K., Pallinger, E., Paloczi, K., Pasztoi, M., Misjak, P., Deli, M.A., Sipos, A., Szalai, A., Voszka, I., Polgar, A., Toth, K., Csete, M., Nagy, G., Gay, S., Falus, A., Kittel, A. & Buzas, E.I. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* **117**, e39-48 (2011).
168. Hahn, C., Wang, C., Orr, A.W., Coon, B.G. & Schwartz, M.A. JNK2 promotes endothelial cell alignment under flow. *PLoS One* **6**, e24338 (2011).
169. Haidekker, M.A., L'Heureux, N. & Frangos, J.A. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1401-1406 (2000).
170. Hamik, A., Lin, Z., Kumar, A., Balcells, M., Sinha, S., Katz, J., Feinberg, M.W., Gerzsten, R.E., Edelman, E.R. & Jain, M.K. Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem* **282**, 13769-13779 (2007).
171. Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B. & Drexler, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* **91**, 7A-11A (2003).
172. Hecker, M. & Ullrich, V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis. *J Biol Chem* **264**, 141-150 (1989).
173. Heiss, C., Amabile, N., Lee, A.C., Real, W.M., Schick, S.F., Lao, D., Wong, M.L., Jahn, S., Angeli, F.S., Minasi, P., Springer, M.L., Hammond, S.K., Glantz, S.A., Grossman, W., Balmes, J.R. & Yeghiazarians, Y. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol* **51**, 1760-1771 (2008).
174. Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R.A. & Dimmeler, S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* **14**, 249-256 (2012).

175. Hermann, C., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 3588-3592 (1997).
176. Herranz, B., Marquez, S., Guijarro, B., Aracil, E., Aicart-Ramos, C., Rodriguez-Crespo, I., Serrano, I., Rodriguez-Puyol, M., Zaragoza, C. & Saura, M. Integrin-linked kinase regulates vasomotor function by preventing endothelial nitric oxide synthase uncoupling: role in atherosclerosis. *Circ Res* **110**, 439-449 (2012).
177. Hierck, B.P., Van der Heiden, K., Alkemade, F.E., Van de Pas, S., Van Thienen, J.V., Groenendijk, B.C., Bax, W.H., Van der Laarse, A., Deruiter, M.C., Horrevoets, A.J. & Poelmann, R.E. Primary cilia sensitize endothelial cells for fluid shear stress. *Dev Dyn* **237**, 725-735 (2008).
178. Higgs, E.A., Moncada, S., Vane, J.R., Caen, J.P., Michel, H. & Tobelem, G. Effect of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins* **16**, 17-22 (1978).
179. Hipper, A. & Isenberg, G. Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch* **440**, 19-27 (2000).
180. Hristov, M., Erl, W., Linder, S. & Weber, P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* **104**, 2761-2766 (2004).
181. Hsieh, H.J., Li, N.Q. & Frangos, J.A. Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells is mediated by protein kinase C. *J Cell Physiol* **150**, 552-558 (1992).
182. Hsu, P.P., Li, S., Li, Y.S., Usami, S., Ratcliffe, A., Wang, X. & Chien, S. Effects of flow patterns on endothelial cell migration into a zone of mechanical denudation. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 751-759 (2001).
183. Hu, Y.L. & Chien, S. Effects of shear stress on protein kinase C distribution in endothelial cells. *J Histochem Cytochem* **45**, 237-249 (1997).
184. Huber, J., Vales, A., Mitulovic, G., Blumer, M., Schmid, R., Witztum, J.L., Binder, B.R. & Leitinger, N. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 101-107 (2002).
185. Huber, L.C., Jungel, A., Distler, J.H., Moritz, F., Gay, R.E., Michel, B.A., Pisetsky, D.S., Gay, S. & Distler, O. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis* **12**, 363-374 (2007).
186. Hugel, B., Martinez, M.C., Kunzelmann, C. & Freyssinet, J.M. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* **20**, 22-27 (2005).
187. Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., Nana-Sinkam, S.P., Jarjoura, D. & Marsh, C.B. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* **3**, e3694 (2008).
188. Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C. & Ley, K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* **9**, 61-67 (2003).
189. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
190. Inoue, N., Kawashima, S., Hirata, K.I., Rikitake, Y., Takeshita, S., Yamochi, W., Akita, H. & Yokoyama, M. Stretch force on vascular smooth muscle cells enhances oxidation of LDL via superoxide production. *Am J Physiol* **274**, H1928-1932 (1998).

191. Ishida, T., Peterson, T.E., Kovach, N.L. & Berk, B.C. MAP kinase activation by flow in endothelial cells. Role of beta 1 integrins and tyrosine kinases. *Circ Res* **79**, 310-316 (1996).
192. Ito, T., Kato, T., Iwama, Y., Muramatsu, M., Shimizu, K., Asano, H., Okumura, K., Hashimoto, H. & Satake, T. Prostaglandin H2 as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with endothelium-derived nitric oxide. *J Hypertens* **9**, 729-736 (1991).
193. Jalali, S., Li, Y.S., Sotoudeh, M., Yuan, S., Li, S., Chien, S. & Shyy, J.Y. Shear stress activates p60src-Ras-MAPK signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 227-234 (1998).
194. Jansen, F., Yang, X., Hoyer, F.F., Paul, K., Heiermann, N., Becher, M.U., Hussein, N.A., Kebschull, M., Bedorf, J., Franklin, B.S., Latz, E., Nickenig, G. & Werner, N. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin i/phosphatidylserine receptor dependent and prevents apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1925-1935 (2012).
195. Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M., Soderland, C., Horstman, L.L. & Ahn, Y.S. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* **109**, 175-180 (2003).
196. Jin, X., Mitsumata, M., Yamane, T. & Yoshida, Y. Induction of human inhibitor of apoptosis protein-2 by shear stress in endothelial cells. *FEBS Lett* **529**, 286-292 (2002).
197. Jin, Z.G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A.O., Frame, M.D. & Berk, B.C. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* **93**, 354-363 (2003).
198. Jo, H., Dull, R.O., Hollis, T.M. & Tarbell, J.M. Endothelial albumin permeability is shear dependent, time dependent, and reversible. *Am J Physiol* **260**, H1992-1996 (1991).
199. Jo, H., Sipos, K., Go, Y.M., Law, R., Rong, J. & McDonald, J.M. Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* **272**, 1395-1401 (1997).
200. Jow, F. & Numann, R. Fluid flow modulates calcium entry and activates membrane currents in cultured human aortic endothelial cells. *J Membr Biol* **171**, 127-139 (1999).
201. Jude, B., Zawadzki, C., Susen, S. & Corseaux, D. Relevance of tissue factor in cardiovascular disease. *Arch Mal Coeur Vaiss* **98**, 667-671 (2005).
202. Jungel, A., Distler, O., Schulze-Horsel, U., Huber, L.C., Ha, H.R., Simmen, B., Kalden, J.R., Pisetsky, D.S., Gay, S. & Distler, J.H. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis Rheum* **56**, 3564-3574 (2007).
203. Jy, W., Horstman, L.L., Jimenez, J.J., Ahn, Y.S., Biro, E., Nieuwland, R., Sturk, A., Dignat-George, F., Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Hugel, B., Zobairi, F., Freyssinet, J.M., Nomura, S., Shet, A.S., Key, N.S. & Hebbel, R.P. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* **2**, 1842-1851 (2004).
204. Kang, H., Fan, Y., Sun, A. & Deng, X. Compositional or charge density modification of the endothelial glycocalyx accelerates flow-dependent concentration polarization of low-density lipoproteins. *Exp Biol Med (Maywood)* **236**, 800-807 (2011).

205. Katopodis, J.N., Kolodny, L., Jy, W., Horstman, L.L., De Marchena, E.J., Tao, J.G., Haynes, D.H. & Ahn, Y.S. Platelet microparticles and calcium homeostasis in acute coronary ischemias. *Am J Hematol* **54**, 95-101 (1997).
206. Katusic, Z.S. & Vanhoutte, P.M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* **257**, H33-37 (1989).
207. Kedzierski, R.M. & Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 851-876 (2001).
208. Kemeny, S.F., Figueroa, D.S., Andrews, A.M., Barbee, K.A. & Clyne, A.M. Glycated collagen alters endothelial cell actin alignment and nitric oxide release in response to fluid shear stress. *J Biomech* **44**, 1927-1935 (2011).
209. Kojda, G. & Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* **43**, 562-571 (1999).
210. Kolodgie, F.D., Gold, H.K., Burke, A.P., Fowler, D.R., Kruth, H.S., Weber, D.K., Farb, A., Guerrero, L.J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A.V. & Virmani, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* **349**, 2316-2325 (2003).
211. Koppler, B., Cohen, C., Schlondorff, D. & Mack, M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* **36**, 648-660 (2006).
212. Kornek, M., Popov, Y., Libermann, T.A., Afdhal, N.H. & Schuppan, D. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* **53**, 230-242 (2011).
213. Kuchan, M.J. & Frangos, J.A. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* **264**, H150-156 (1993).
214. Kuebler, W.M., Uhlig, U., Goldmann, T., Schael, G., Kerem, A., Exner, K., Martin, C., Vollmer, E. & Uhlig, S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 1391-1398 (2003).
215. Lacolley, P. Mechanical influence of cyclic stretch on vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **63**, 577-579 (2004).
216. Lacroix, R., Judicone, C., Poncelet, P., Robert, S., Arnaud, L., Sampol, J. & Dignat-George, F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* **10**, 437-446 (2012).
217. Lacroix, R., Sabatier, F., Mialhe, A., Basire, A., Pannell, R., Borghi, H., Robert, S., Lamy, E., Plawinski, L., Camoin-Jau, L., Gurewich, V., Angles-Cano, E. & Dignat-George, F. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* **110**, 2432-2439 (2007).
218. Lamontagne, D., Konig, A., Bassenge, E. & Busse, R. Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**, 652-657 (1992).
219. Larsson, A., Lundahl, T., Eriksson, M., Lundkvist, K. & Lindahl, T. Endotoxin induced platelet microvesicle formation measured by flow cytometry. *Platelets* **7**, 153-158 (1996).
220. Lavi, S., Prasad, A., Yang, E.H., Mathew, V., Simari, R.D., Rihal, C.S., Lerman, L.O. & Lerman, A. Smoking is associated with epicardial coronary endothelial dysfunction and elevated white blood cell count in patients with chest pain and early coronary artery disease. *Circulation* **115**, 2621-2627 (2007).

221. Lawrie, A.S., Albanyan, A., Cardigan, R.A., Mackie, I.J. & Harrison, P. Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* **96**, 206-212 (2009).
222. Lehoux, S., Lemarie, C.A., Esposito, B., Lijnen, H.R. & Tedgui, A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* **109**, 1041-1047 (2004).
223. Leong, H.S., Podor, T.J., Manocha, B. & Lewis, J.D. Validation of flow cytometric detection of platelet microparticles and liposomes by atomic force microscopy. *J Thromb Haemost* **9**, 2466-2476 (2011).
224. Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M., Jourde, N., Brunet, P., Camoin-Jau, L., Sampol, J. & Dignat-George, F. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* **104**, 456-463 (2010).
225. Leroyer, A.S., Ebrahimian, T.G., Cochain, C., Recalde, A., Blanc-Brude, O., Mees, B., Vilar, J., Tedgui, A., Levy, B.I., Chimini, G., Boulanger, C.M. & Silvestre, J.S. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* **119**, 2808-2817 (2009).
226. Leroyer, A.S., Isobe, H., Leseche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., Binder, B.R., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* **49**, 772-777 (2007).
227. Leroyer, A.S., Rautou, P.E., Silvestre, J.S., Castier, Y., Leseche, G., Devue, C., Duriez, M., Brandes, R.P., Lutgens, E., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* **52**, 1302-1311 (2008).
228. Levesque, M.J., Nerem, R.M. & Sprague, E.A. Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow. *Biomaterials* **11**, 702-707 (1990).
229. Levy, J.V. Prostacyclin-induced contraction of isolated aortic strips from normal and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Prostaglandins* **19**, 517-525 (1980).
230. Li, M., Yu, D., Williams, K.J. & Liu, M.L. Tobacco smoke induces the generation of procoagulant microvesicles from human monocytes/macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 1818-1824 (2010).
231. Li, S., Butler, P., Wang, Y., Hu, Y., Han, D.C., Usami, S., Guan, J.L. & Chien, S. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3546-3551 (2002).
232. Li, S., Chen, B.P., Azuma, N., Hu, Y.L., Wu, S.Z., Sumpio, B.E., Shyy, J.Y. & Chien, S. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest* **103**, 1141-1150 (1999).
233. Li, S., Kim, M., Hu, Y.L., Jalali, S., Schlaepfer, D.D., Hunter, T., Chien, S. & Shyy, J.Y. Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **272**, 30455-30462 (1997).
234. Li, Y.S., Shyy, J.Y., Li, S., Lee, J., Su, B., Karin, M. & Chien, S. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol Cell Biol* **16**, 5947-5954 (1996).
235. Libby, P., Ridker, P.M. & Hansson, G.K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2129-2138 (2009).
236. Lin, K., Hsu, P.P., Chen, B.P., Yuan, S., Usami, S., Shyy, J.Y., Li, Y.S. & Chien, S. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9385-9389 (2000).



237. Lin, S.J., Jan, K.M., Weinbaum, S. & Chien, S. Transendothelial transport of low density lipoprotein in association with cell mitosis in rat aorta. *Arteriosclerosis* **9**, 230-236 (1989).
238. Litvack, M.L., Post, M. & Palaniyar, N. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS One* **6**, e17223 (2011).
239. Liu, M.L., Reilly, M.P., Casasanto, P., McKenzie, S.E. & Williams, K.J. Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 430-435 (2007).
240. Liu, X.M., Ensenat, D., Wang, H., Schafer, A.I. & Durante, W. Physiologic cyclic stretch inhibits apoptosis in vascular endothelium. *FEBS Lett* **541**, 52-56 (2003).
241. Liu, Y., Chen, B.P., Lu, M., Zhu, Y., Stemerman, M.B., Chien, S. & Shyy, J.Y. Shear stress activation of SREBP1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 76-81 (2002).
242. Liu, Y., Zhu, Y., Rannou, F., Lee, T.S., Formentin, K., Zeng, L., Yuan, X., Wang, N., Chien, S., Forman, B.M. & Shyy, J.Y. Laminar flow activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular endothelial cells. *Circulation* **110**, 1128-1133 (2004).
243. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Camino-Lopez, S., Llampayas, O. & Badimon, L. Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* **110**, 452-459 (2004).
244. Malek, A.M., Alper, S.L. & Izumo, S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* **282**, 2035-2042 (1999).
245. Malek, A.M. & Izumo, S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* **109** ( Pt 4), 713-726 (1996).
246. Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M. & Tedgui, A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **101**, 841-843 (2000).
247. Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J.M. & Tedgui, A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99**, 348-353 (1999).
248. Mamdouh, Z., Mikhailov, A. & Muller, W.A. Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J Exp Med* **206**, 2795-2808 (2009).
249. Maniotis, A.J., Chen, C.S. & Ingber, D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 849-854 (1997).
250. Manno, S., Takakuwa, Y. & Mohandas, N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1943-1948 (2002).
251. Martin, C., Riou, B. & Valley, B. *Physiologie Humaine Appliquée*, (2006).
252. Martin, S., Tesse, A., Hugel, B., Martinez, M.C., Morel, O., Freyssinet, J.M. & Andriantsitohaina, R. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* **109**, 1653-1659 (2004).

253. Martinez de Lizarrondo, S., Roncal, C., Calvayrac, O., Rodriguez, C., Varo, N., Purroy, A., Lorente, L., Rodriguez, J.A., Doeuvre, L., Hervas-Stubbs, S., Angles-Cano, E., Paramo, J.A., Martinez-Gonzalez, J. & Orbe, J. Synergistic effect of thrombin and CD40 ligand on endothelial matrix metalloproteinase-10 expression and microparticle generation in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1477-1487 (2012).
254. Masaki, T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 235-255 (1995).
255. Mastronardi, M.L., Mostefai, H.A., Soleti, R., Agouni, A., Martinez, M.C. & Andriantsitohaina, R. Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells. *Fundam Clin Pharmacol* **25**, 653-660 (2011).
256. Mata-Greenwood, E., Grobe, A., Kumar, S., Noskina, Y. & Black, S.M. Cyclic stretch increases VEGF expression in pulmonary arterial smooth muscle cells via TGF-beta1 and reactive oxygen species: a requirement for NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**, L288-289 (2005).
257. Matsushita, H., Lee, K.H. & Tsao, P.S. Cyclic strain induces reactive oxygen species production via an endothelial NAD(P)H oxidase. *J Cell Biochem Suppl* **Suppl 36**, 99-106 (2001).
258. Matthay, M.A., Bhattacharya, S., Gaver, D., Ware, L.B., Lim, L.H., Syrkina, O., Eyal, F. & Hubmayr, R. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**, L678-682 (2002).
259. Matthay, M.A., Zimmerman, G.A., Esmon, C., Bhattacharya, J., Collier, B., Doerschuk, C.M., Floros, J., Gimbrone, M.A., Jr., Hoffman, E., Hubmayr, R.D., Leppert, M., Matalon, S., Munford, R., Parsons, P., Slutsky, A.S., Tracey, K.J., Ward, P., Gail, D.B. & Harabin, A.L. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1027-1035 (2003).
260. Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R.R. & Weber, C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1512-1518 (2005).
261. Mause, S.F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* **107**, 1047-1057 (2010).
262. Mayr, M., Grainger, D., Mayr, U., Leroyer, A.S., Leseche, G., Sidibe, A., Herbin, O., Yin, X., Gomes, A., Madhu, B., Griffiths, J.R., Xu, Q., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 379-388 (2009).
263. McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H. & Harrison, D.G. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H2290-2297 (2003).
264. Mesri, M. & Altieri, D.C. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* **161**, 4382-4387 (1998).
265. Mesri, M. & Altieri, D.C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 23111-23118 (1999).
266. Mezentsev, A., Merks, R.M., O'Riordan, E., Chen, J., Mendelev, N., Goligorsky, M.S. & Brodsky, S.V. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1106-1114 (2005).
267. Miao, H., Hu, Y.L., Shiu, Y.T., Yuan, S., Zhao, Y., Kaunas, R., Wang, Y., Jin, G., Usami, S. & Chien, S. Effects of flow patterns on the localization and expression of

- VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations. *J Vasc Res* **42**, 77-89 (2005).
268. Michel, J.B. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 2146-2154 (2003).
  269. Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 15-26 (2011).
  270. Morel, O., Jesel, L., Hugel, B., Douchet, M.P., Zupan, M., Chauvin, M., Freyssinet, J.M. & Toti, F. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* **1**, 171-177 (2003).
  271. Morel, O., Toti, F., Jesel, L. & Freyssinet, J.M. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *Semin Thromb Hemost* **36**, 833-844 (2010).
  272. Morel, O., Toti, F., Morel, N. & Freyssinet, J.M. Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica* **94**, 313-317 (2009).
  273. Moreno, P.R., Purushothaman, K.R., Sirol, M., Levy, A.P. & Fuster, V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation* **113**, 2245-2252 (2006).
  274. Morgan, J.T., Pfeiffer, E.R., Thirkill, T.L., Kumar, P., Peng, G., Fridolfsson, H.N., Douglas, G.C., Starr, D.A. & Barakat, A.I. Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. *Mol Biol Cell* **22**, 4324-4334 (2011).
  275. Morita, T., Kurihara, H., Maemura, K., Yoshizumi, M., Nagai, R. & Yazaki, Y. Role of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ Res* **75**, 630-636 (1994).
  276. Mosse, P.R., Campbell, G.R., Wang, Z.L. & Campbell, J.H. Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media. *Lab Invest* **53**, 556-562 (1985).
  277. Mostefai, H.A., Meziani, F., Mastronardi, M.L., Agouni, A., Heymes, C., Sargentini, C., Asfar, P., Martinez, M.C. & Andriantsitohaina, R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 1148-1155 (2008).
  278. Muller, W.A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol* **6**, 323-344 (2011).
  279. Mulvany, M.J. & Aalkjaer, C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* **70**, 921-961 (1990).
  280. Nagel, T., Resnick, N., Dewey, C.F., Jr. & Gimbrone, M.A., Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1825-1834 (1999).
  281. Nakao, M., Ono, K., Fujisawa, S. & Iijima, T. Mechanical stress-induced Ca<sup>2+</sup> entry and Cl<sup>-</sup> current in cultured human aortic endothelial cells. *Am J Physiol* **276**, C238-249 (1999).
  282. Neri, T., Armani, C., Pegoli, A., Cordazzo, C., Carmazzi, Y., Brunelleschi, S., Bardelli, C., Breschi, M.C., Paggiaro, P. & Celi, A. Role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles. *Eur Respir J* (2010).
  283. Nguyen, K.T., Frye, S.R., Eskin, S.G., Patterson, C., Runge, M.S. & McIntire, L.V. Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **38**, 1038-1043 (2001).

284. Ni, C.W., Hsieh, H.J., Chao, Y.J. & Wang, D.L. Shear flow attenuates serum-induced STAT3 activation in endothelial cells. *J Biol Chem* **278**, 19702-19708 (2003).
285. Ni, C.W., Wang, D.L., Lien, S.C., Cheng, J.J., Chao, Y.J. & Hsieh, H.J. Activation of PKC-epsilon and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide. *J Cell Physiol* **195**, 428-434 (2003).
286. Nieuwland, R., Berckmans, R.J., McGregor, S., Boing, A.N., Romijn, F.P., Westendorp, R.G., Hack, C.E. & Sturk, A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930-935 (2000).
287. Nieuwland, R., Berckmans, R.J., Rotteveel-Eijkman, R.C., Maquelin, K.N., Roozendaal, K.J., Jansen, P.G., ten Have, K., Eijssman, L., Hack, C.E. & Sturk, A. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* **96**, 3534-3541 (1997).
288. Nomura, S., Inami, N., Kimura, Y., Omoto, S., Shouzu, A., Nishikawa, M. & Iwasaka, T. Effect of nifedipine on adiponectin in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* **21**, 38-44 (2007).
289. Nomura, S., Nakamura, T., Cone, J., Tandon, N.N. & Kambayashi, J. Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry* **40**, 173-181 (2000).
290. Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Inami, N., Ueba, T., Urase, F. & Maeda, Y. Effects of eicosapentaenoic acid on endothelial cell-derived microparticles, angiopoietins and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* **16**, 83-90 (2009).
291. Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M. & Iwasaka, T. Benidipine improves oxidized LDL-dependent monocyte and endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* **19**, 551-557 (2005).
292. Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M., Iwasaka, T. & Fukuhara, S. Activated platelet and oxidized LDL induce endothelial membrane vesiculation: clinical significance of endothelial cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *Clin Appl Thromb Hemost* **10**, 205-215 (2004).
293. Nomura, S., Shouzu, A., Taomoto, K., Togane, Y., Goto, S., Ozaki, Y., Uchiyama, S. & Ikeda, Y. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. *J Atheroscler Thromb* **16**, 878-887 (2009).
294. Nomura, S., Tandon, N.N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S. & Kambayashi, J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* **158**, 277-287 (2001).
295. Nozaki, T., Sugiyama, S., Koga, H., Sugamura, K., Ohba, K., Matsuzawa, Y., Sumida, H., Matsui, K., Jinnouchi, H. & Ogawa, H. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* **54**, 601-608 (2009).
296. Ochoa, C.D., Baker, H., Hasak, S., Matyal, R., Salam, A., Hales, C.A., Hancock, W. & Quinn, D.A. Cyclic stretch affects pulmonary endothelial cell control of pulmonary smooth muscle cell growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 105-112 (2008).
297. Okabe, T.A., Shimada, K., Hattori, M., Murayama, T., Yokode, M., Kita, T. & Kishimoto, C. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res* **74**, 537-545 (2007).
298. Olas, B., Malinowska, J. & Rywaniak, J. Homocysteine and its thiolactone may promote apoptotic events in blood platelets in vitro. *Platelets* **21**, 533-540 (2010).

299. Olesen, S.P., Clapham, D.E. & Davies, P.F. Haemodynamic shear stress activates a K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Nature* **331**, 168-170 (1988).
300. Osawa, M., Masuda, M., Harada, N., Lopes, R.B. & Fujiwara, K. Tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in mechanically stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Cell Biol* **72**, 229-237 (1997).
301. Osawa, M., Masuda, M., Kusano, K. & Fujiwara, K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol* **158**, 773-785 (2002).
302. Pahakis, M.Y., Kosky, J.R., Dull, R.O. & Tarbell, J.M. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 228-233 (2007).
303. Palade, G.E., Simionescu, M. & Simionescu, N. Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl* **463**, 11-32 (1979).
304. Passerini, A.G., Polacek, D.C., Shi, C., Francesco, N.M., Manduchi, E., Grant, G.R., Pritchard, W.F., Powell, S., Chang, G.Y., Stoeckert, C.J., Jr. & Davies, P.F. Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2482-2487 (2004).
305. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183 (2001).
306. Peiro, C., Redondo, J., Rodriguez-Martinez, M.A., Angulo, J., Marin, J. & Sanchez-Ferrer, C.F. Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* **25**, 748-751 (1995).
307. Perez-Casal, M., Downey, C., Cutillas-Moreno, B., Zuzel, M., Fukudome, K. & Toh, C.H. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* **94**, 387-394 (2009).
308. Perez-Casal, M., Downey, C., Fukudome, K., Marx, G. & Toh, C.H. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood* **105**, 1515-1522 (2005).
309. Peterson, D.B., Sander, T., Kaul, S., Wakim, B.T., Halligan, B., Twigger, S., Pritchard, K.A., Jr., Oldham, K.T. & Ou, J.S. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* **8**, 2430-2446 (2008).
310. Pfister, S.L. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* **43**, 428-433 (2004).
311. Piguet, P.F., Vesin, C. & Da Kan, C. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine* **18**, 222-230 (2002).
312. Pirro, M., Schillaci, G., Paltriccia, R., Bagaglia, F., Menecali, C., Mannarino, M.R., Capanni, M., Velardi, A. & Mannarino, E. Increased ratio of CD31+/CD42-microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2530-2535 (2006).
313. Potter, D.R. & Damiano, E.R. The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro. *Circ Res* **102**, 770-776 (2008).
314. Putnam, A.J., Cunningham, J.J., Pillemer, B.B. & Mooney, D.J. External mechanical strain regulates membrane targeting of Rho GTPases by controlling microtubule assembly. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C627-639 (2003).
315. Pyorala, K., Laakso, M. & Uusitupa, M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* **3**, 463-524 (1987).

316. Qin, X., Wang, X., Wang, Y., Tang, Z., Cui, Q., Xi, J., Li, Y.S., Chien, S. & Wang, N. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3240-3244 (2010).
317. Quinn, P.A. & Ng, L.L. Potassium and activity of the sodium hydrogen exchanger isoform 1 in vascular smooth muscle of hypertensive rats. *Metabolism* **50**, 778-782 (2001).
318. Raaz, U., Kuhn, H., Wirtz, H. & Hammerschmidt, S. Rapamycin reduces high-amplitude, mechanical stretch-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* **77**, 297-303 (2009).
319. Ramasamy, R., Vannucci, S.J., Yan, S.S., Herold, K., Yan, S.F. & Schmidt, A.M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* **15**, 16R-28R (2005).
320. Ramkhalawon, B., Vilar, J., Rivas, D., Mees, B., de Crom, R., Tedgui, A. & Lehoux, S. Shear stress regulates angiotensin type 1 receptor expression in endothelial cells. *Circ Res* **105**, 869-875 (2009).
321. Rand, M.L., Wang, H., Bang, K.W., Packham, M.A. & Freedman, J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost* **4**, 1621-1623 (2006).
322. Rank, A., Nieuwland, R., Crispin, A., Grutzner, S., Iberer, M., Toth, B. & Pihusch, R. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* **22**, 111-116 (2011).
323. Rapoport, R.M. & Williams, S.P. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* **28**, 64-75 (1996).
324. Ratajczak, J., Kijowski, J., Majka, M., Jankowski, K., Reca, R. & Ratajczak, M.Z. Biological significance of the different erythropoietic factors secreted by normal human early erythroid cells. *Leuk Lymphoma* **44**, 767-774 (2003).
325. Rautou, P.E., Bresson, J., Sainte-Marie, Y., Vion, A.C., Paradis, V., Renard, J.M., Devue, C., Heymes, C., Letteron, P., Elkrif, L., Lebrec, D., Valla, D., Tedgui, A., Moreau, R. & Boulanger, C.M. Abnormal plasma microparticles impair vasoconstrictor responses in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* **143**, 166-176 e166 (2012).
326. Rautou, P.E., Leroyer, A.S., Ramkhalawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A.C., Nalbone, G., Castier, Y., Leseche, G., Lehoux, S., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1-Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration. *Circ Res* **108**, 335-343 (2011).
327. Rautou, P.E., Vion, A.C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A. & Boulanger, C.M. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* **109**, 593-606 (2011).
328. Reischl, A., Reithmayer, M., Winsauer, G., Moser, R., Gosler, I. & Blaas, D. Viral evolution toward change in receptor usage: adaptation of a major group human rhinovirus to grow in ICAM-1-negative cells. *J Virol* **75**, 9312-9319 (2001).
329. Remuzzi, A., Dewey, C.F., Jr., Davies, P.F. & Gimbrone, M.A., Jr. Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro. *Biorheology* **21**, 617-630 (1984).
330. Robert, S., Lacroix, R., Poncelet, P., Harhour, K., Bouriche, T., Judicone, C., Wischhusen, J., Arnaud, L. & Dignat-George, F. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1054-1058 (2012).

331. Romanenko, V.G., Davies, P.F. & Levitan, I. Dual effect of fluid shear stress on volume-regulated anion current in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C708-718 (2002).
332. Rubanyi, G.M. & Vanhoutte, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**, H822-827 (1986).
333. Sabatier, F., Camoin-Jau, L., Anfosso, F., Sampol, J. & Dignat-George, F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* **13**, 454-471 (2009).
334. Sabatier, F., Roux, V., Anfosso, F., Camoin, L., Sampol, J. & Dignat-George, F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* **99**, 3962-3970 (2002).
335. Sambola, A., Osende, J., Hathcock, J., Degen, M., Nemerson, Y., Fuster, V., Crandall, J. & Badimon, J.J. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* **107**, 973-977 (2003).
336. Sapet, C., Simoncini, S., Lloriod, B., Puthier, D., Sampol, J., Nguyen, C., Dignat-George, F. & Anfosso, F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* **108**, 1868-1876 (2006).
337. Sarkar, A., Mitra, S., Mehta, S., Raices, R. & Wewers, M.D. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* **4**, e7140 (2009).
338. Sastry, S.K. & Horwitz, A.F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 819-831 (1993).
339. Scanu, A., Molnarfi, N., Brandt, K.J., Gruaz, L., Dayer, J.M. & Burger, D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol* **83**, 921-927 (2008).
340. Schechter, A.D., Giesen, P.L., Taby, O., Rosenfield, C.L., Rossikhina, M., Fyfe, B.S., Kohtz, D.S., Fallon, J.T., Nemerson, Y. & Taubman, M.B. Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest* **100**, 2276-2285 (1997).
341. Schechter, A.D., Spirn, B., Rossikhina, M., Giesen, P.L., Bogdanov, V., Fallon, J.T., Fisher, E.A., Schnapp, L.M., Nemerson, Y. & Taubman, M.B. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* **87**, 126-132 (2000).
342. Schini, V.B. & Vanhoutte, P.M. Endothelin-1: a potent vasoactive peptide. *Pharmacol Toxicol* **69**, 303-309 (1991).
343. Schini-Kerth, V.B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol* **6**, 355-363 (1999).
344. Schlaepfer, D.D., Jones, K.C. & Hunter, T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* **18**, 2571-2585 (1998).
345. Schoenwaelder, S.M., Yuan, Y., Josefsson, E.C., White, M.J., Yao, Y., Mason, K.D., O'Reilly, L.A., Henley, K.J., Ono, A., Hsiao, S., Willcox, A., Roberts, A.W., Huang, D.C., Salem, H.H., Kile, B.T. & Jackson, S.P. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood* **114**, 663-666 (2009).
346. Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Herman, A.G. & Martinet, W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res* **73**, 470-480 (2007).

347. Schwenke, D.C. & Carew, T.E. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* **9**, 895-907 (1989).
348. Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. & Breard, J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**, 346-352 (2001).
349. Seebach, J., Donnert, G., Kronstein, R., Werth, S., Wojciak-Stothard, B., Falzarano, D., Mrowietz, C., Hell, S.W. & Schnittler, H.J. Regulation of endothelial barrier function during flow-induced conversion to an arterial phenotype. *Cardiovasc Res* **75**, 596-607 (2007).
350. Sekula, M., Janawa, G., Stankiewicz, E. & Stepień, E. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine in vitro. *Cell Mol Biol Lett* **16**, 69-78 (2011).
351. SenBanerjee, S., Lin, Z., Atkins, G.B., Greif, D.M., Rao, R.M., Kumar, A., Feinberg, M.W., Chen, Z., Simon, D.I., Luscinskas, F.W., Michel, T.M., Gimbrone, M.A., Jr., Garcia-Cardena, G. & Jain, M.K. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* **199**, 1305-1315 (2004).
352. Shet, A.S., Aras, O., Gupta, K., Hass, M.J., Rausch, D.J., Saba, N., Koopmeiners, L., Key, N.S. & Hebbel, R.P. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **102**, 2678-2683 (2003).
353. Shi, Z.D. & Tarbell, J.M. Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Ann Biomed Eng* **39**, 1608-1619 (2011).
354. Shikata, Y., Rios, A., Kawkitinarong, K., DePaola, N., Garcia, J.G. & Birukov, K.G. Differential effects of shear stress and cyclic stretch on focal adhesion remodeling, site-specific FAK phosphorylation, and small GTPases in human lung endothelial cells. *Exp Cell Res* **304**, 40-49 (2005).
355. Shimada, K., Kishimoto, C., Okabe, T.A., Hattori, M., Murayama, T., Yokode, M. & Kita, T. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J* **71**, 1147-1151 (2007).
356. Shimizu, S., Ishii, M., Yamamoto, T., Kawanishi, T., Momose, K. & Kuroiwa, Y. Bradykinin induces generation of reactive oxygen species in bovine aortic endothelial cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **84**, 301-314 (1994).
357. Shirotani, M., Yui, Y., Hattori, R. & Kawai, C. U-61,431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins* **41**, 97-110 (1991).
358. Shiu, Y.T., Li, S., Yuan, S., Wang, Y., Nguyen, P. & Chien, S. Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 548-555 (2003).
359. Shyy, J.Y. & Chien, S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* **91**, 769-775 (2002).
360. Siedlecki, C.A., Wang, I.W., Higashi, J.M., Kottke-Marchant, K. & Marchant, R.E. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials* **20**, 1521-1529 (1999).
361. Silverstein, R.L. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med* **76 Suppl 2**, S27-30 (2009).
362. Simak, J., Holada, K., Risitano, A.M., Zivny, J.H., Young, N.S. & Vostal, J.G. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* **125**, 804-813 (2004).



363. Simak, J., Holada, K. & Vostal, J.G. Release of annexin V-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol* **3**, 11 (2002).
364. Simoncini, S., Njock, M.S., Robert, S., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Harle, J.R., Nguyen, C., Dignat-George, F. & Anfosso, F. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res* **104**, 943-951 (2009).
365. Sipkema, P., van der Linden, P.J., Westerhof, N. & Yin, F.C. Effect of cyclic axial stretch of rat arteries on endothelial cytoskeletal morphology and vascular reactivity. *J Biomech* **36**, 653-659 (2003).
366. Smith, P.G., Moreno, R. & Ikebe, M. Strain increases airway smooth muscle contractile and cytoskeletal proteins in vitro. *Am J Physiol* **272**, L20-27 (1997).
367. Smith, P.G., Roy, C., Fisher, S., Huang, Q.Q. & Brozovich, F. Selected contribution: mechanical strain increases force production and calcium sensitivity in cultured airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* **89**, 2092-2098 (2000).
368. Smyth, E.M., Austin, S.C. & FitzGerald, G.A. Activation-dependent internalization of the human prostacyclin receptor. *Adv Exp Med Biol* **507**, 295-301 (2002).
369. Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R. & Martinez, M.C. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* **30**, 580-588 (2009).
370. Sprague, E.A., Luo, J. & Palmaz, J.C. Human aortic endothelial cell migration onto stent surfaces under static and flow conditions. *J Vasc Interv Radiol* **8**, 83-92 (1997).
371. Stampfuss, J.J., Censarek, P., Fischer, J.W., Schror, K. & Weber, A.A. Rapid release of active tissue factor from human arterial smooth muscle cells under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, e34-37 (2006).
372. Standley, P.R., Cammarata, A., Nolan, B.P., Purgason, C.T. & Stanley, M.A. Cyclic stretch induces vascular smooth muscle cell alignment via NO signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H1907-1914 (2002).
373. Stassen, J.M., Arnout, J. & Deckmyn, H. The hemostatic system. *Curr Med Chem* **11**, 2245-2260 (2004).
374. Stemerman, M.B., Morrel, E.M., Burke, K.R., Colton, C.K., Smith, K.A. & Lees, R.S. Local variation in arterial wall permeability to low density lipoprotein in normal rabbit aorta. *Arteriosclerosis* **6**, 64-69 (1986).
375. Stone, P.H., Coskun, A.U., Kinlay, S., Clark, M.E., Sonka, M., Wahle, A., Ilegbusi, O.J., Yeghiazarians, Y., Popma, J.J., Orav, J., Kuntz, R.E. & Feldman, C.L. Effect of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling, and in-stent restenosis in humans: in vivo 6-month follow-up study. *Circulation* **108**, 438-444 (2003).
376. Surapisitchat, J., Hoefen, R.J., Pi, X., Yoshizumi, M., Yan, C. & Berk, B.C. Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6476-6481 (2001).
377. Suvatne, J., Barakat, A.I. & O'Donnell, M.E. Flow-induced expression of endothelial Na-K-Cl cotransport: dependence on K(+) and Cl(-) channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C216-227 (2001).
378. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J. & Nagata, S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **468**, 834-838 (2010).

379. Swirski, F.K., Pittet, M.J., Kircher, M.F., Aikawa, E., Jaffer, F.A., Libby, P. & Weissleder, R. Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10340-10345 (2006).
380. Szotowski, B., Antoniak, S., Goldin-Lang, P., Tran, Q.V., Pels, K., Rosenthal, P., Bogdanov, V.Y., Borchert, H.H., Schultheiss, H.P. & Rauch, U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res* **73**, 806-812 (2007).
381. Tabouillot, T., Muddana, H.S. & Butler, P.J. Endothelial Cell Membrane Sensitivity to Shear Stress is Lipid Domain Dependent. *Cell Mol Bioeng* **4**, 169-181 (2011).
382. Tai, L.K., Okuda, M., Abe, J., Yan, C. & Berk, B.C. Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1790-1796 (2002).
383. Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A. & Dolo, V. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* **160**, 673-680 (2002).
384. Tardy, Y., Resnick, N., Nagel, T., Gimbrone, M.A., Jr. & Dewey, C.F., Jr. Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 3102-3106 (1997).
385. Thi, M.M., Tarbell, J.M., Weinbaum, S. & Spray, D.C. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16483-16488 (2004).
386. Thomas, G.M., Panicot-Dubois, L., Lacroix, R., Dignat-George, F., Lombardo, D. & Dubois, C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* **206**, 1913-1927 (2009).
387. Torr, E.E., Gardner, D.H., Thomas, L., Goodall, D.M., Bielemeier, A., Willetts, R., Griffiths, H.R., Marshall, L.J. & Devitt, A. Apoptotic cell-derived ICAM-3 promotes both macrophage chemoattraction to and tethering of apoptotic cells. *Cell Death Differ* **19**, 671-679 (2012).
388. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B. & Simons, M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244-1247 (2008).
389. Tramontano, A.F., O'Leary, J., Black, A.D., Muniyappa, R., Cutaia, M.V. & El-Sherif, N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 34-38 (2004).
390. Traub, O., Monia, B.P., Dean, N.M. & Berk, B.C. PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 31251-31257 (1997).
391. Tzima, E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res* **98**, 176-185 (2006).
392. Tzima, E., Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Mohamed, S.A., Li, S., Chien, S. & Schwartz, M.A. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *EMBO J* **21**, 6791-6800 (2002).
393. Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Dejana, E., Schultz, D.A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H. & Schwartz, M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431 (2005).

394. Ullal, A.J. & Pisetsky, D.S. The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis* **15**, 586-596 (2010).
395. Usatyuk, P.V. & Natarajan, V. Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells. *J Biol Chem* **279**, 11789-11797 (2004).
396. Usatyuk, P.V., Vepa, S., Watkins, T., He, D., Parinandi, N.L. & Natarajan, V. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **5**, 723-730 (2003).
397. van den Berg, B.M., Vink, H. & Spaan, J.A. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* **92**, 592-594 (2003).
398. van der Pol, E., Hoekstra, A.G., Sturk, A., Otto, C., van Leeuwen, T.G. & Nieuwland, R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* **8**, 2596-2607 (2010).
399. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).
400. Vanhoutte, P.M. Control of vascular function. Role of the non-muscle components. *Mayo Clin Proc* **57 Suppl**, 20-27 (1982).
401. Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest* **107**, 23-25 (2001).
402. Vanhoutte, P.M., Fournet-Bourguignon, M.P. & Vilaine, J.P. [Dysfunction of the nitric oxide pathway during coronary endothelium regeneration]. *Bull Acad Natl Med* **186**, 1525-1539; discussion 1540-1521 (2002).
403. VanWijk, M.J., Nieuwland, R., Boer, K., van der Post, J.A., VanBavel, E. & Sturk, A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* **187**, 450-456 (2002).
404. Vasina, E.M., Cauwenberghs, S., Feijge, M.A., Heemskerk, J.W., Weber, C. & Koenen, R.R. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis* **2**, e211 (2011).
405. Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B.S., Karoui, H., Tordo, P. & Pritchard, K.A., Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9220-9225 (1998).
406. Vion, A.C., Ramkelawon, B., Loyer, X., Chironi, G., Devue, C., Loirand, G., Tedgui, A., Lehoux, S. & Boulanger, C.M. Laminar Shear Stress Decreases Endothelial Microparticles Release by a Nitric Oxide- and ABCA1-Dependent Mechanism. *arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, Abstract 208 (2012).
407. Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A. & Schwartz, S.M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1262-1275 (2000).
408. Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Finn, A.V., Gold, H.K., Tulenko, T.N., Wrenn, S.P. & Narula, J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2054-2061 (2005).
409. Vyalov, S., Langille, B.L. & Gotlieb, A.I. Decreased blood flow rate disrupts endothelial repair in vivo. *Am J Pathol* **149**, 2107-2118 (1996).
410. Wagner, A.H., Hildebrandt, A., Baumgarten, S., Jungmann, A., Muller, O.J., Sharov, V.S., Schoneich, C. & Hecker, M. Tyrosine nitration limits stretch-induced CD40

- expression and disconnects CD40 signaling in human endothelial cells. *Blood* **118**, 3734-3742 (2011).
411. Walpola, P.L., Gotlieb, A.I., Cybulsky, M.I. & Langille, B.L. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 2-10 (1995).
  412. Wang, B.W., Chang, H., Lin, S., Kuan, P. & Shyu, K.G. Induction of matrix metalloproteinases-14 and -2 by cyclical mechanical stretch is mediated by tumor necrosis factor-alpha in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res* **59**, 460-469 (2003).
  413. Wang, J., Pan, S. & Berk, B.C. Glutaredoxin mediates Akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductase-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1283-1288 (2007).
  414. Wang, J.M., Wang, Y., Huang, J.Y., Yang, Z., Chen, L., Wang, L.C., Tang, A.L., Lou, Z.F. & Tao, J. C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res* **44**, 241-248 (2007).
  415. Wang, S., Zhang, M., Liang, B., Xu, J., Xie, Z., Liu, C., Viollet, B., Yan, D. & Zou, M.H. AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res* **106**, 1117-1128 (2010).
  416. Wang, Y., Chang, J., Li, Y.C., Li, Y.S., Shyy, J.Y. & Chien, S. Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H685-692 (2004).
  417. Wang, Y., Miao, H., Li, S., Chen, K.D., Li, Y.S., Yuan, S., Shyy, J.Y. & Chien, S. Interplay between integrins and FLK-1 in shear stress-induced signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1540-1547 (2002).
  418. Warboys, C.M., Eric Berson, R., Mann, G.E., Pearson, J.D. & Weinberg, P.D. Acute and chronic exposure to shear stress have opposite effects on endothelial permeability to macromolecules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1850-1856 (2010).
  419. Waters, D., Higginson, L., Gladstone, P., Boccuzzi, S.J., Cook, T. & Lesperance, J. Effects of cholesterol lowering on the progression of coronary atherosclerosis in women. A Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (CCAIT) substudy. *Circulation* **92**, 2404-2410 (1995).
  420. Webb, N.R. Getting to the core of atherosclerosis. *Nat Med* **14**, 1015-1016 (2008).
  421. Weber, M., Baker, M.B., Moore, J.P. & Searles, C.D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 643-648 (2010).
  422. Weinbaum, S., Tzeghai, G., Ganatos, P., Pfeffer, R. & Chien, S. Effect of cell turnover and leaky junctions on arterial macromolecular transport. *Am J Physiol* **248**, H945-960 (1985).
  423. Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Kosiol, S. & Nickenig, G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 112-116 (2006).
  424. Willekens, F.L., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y.A., van den Bos, A.G., Bosman, G.J. & van Berkel, T.J. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* **105**, 2141-2145 (2005).
  425. Williams, B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens* **16**, 1921-1929 (1998).

426. Wilson, E., Mai, Q., Sudhir, K., Weiss, R.H. & Ives, H.E. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Biol* **123**, 741-747 (1993).
427. Witek, R.P., Yang, L., Liu, R., Jung, Y., Omenetti, A., Syn, W.K., Choi, S.S., Cheong, Y., Fearing, C.M., Agboola, K.M., Chen, W. & Diehl, A.M. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology* **136**, 320-330 e322 (2009).
428. Wojciak-Stothard, B. & Ridley, A.J. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol* **161**, 429-439 (2003).
429. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**, 269-288 (1967).
430. Wu, K.K. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. *J Formos Med Assoc* **95**, 661-666 (1996).
431. Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Jr., Wang, K.C., Geary, G.G., Zhang, Y., Wang, W.C., Huang, H.D., Zhou, J., Li, Y.S., Chien, S., Garcia-Cardena, G. & Shyy, J.Y. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation* **124**, 633-641 (2011).
432. Wung, B.S., Cheng, J.J., Shyue, S.K. & Wang, D.L. NO modulates monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells under cyclic strain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1941-1947 (2001).
433. Yamada, T., Naruse, K. & Sokabe, M. Stretch-induced morphological changes of human endothelial cells depend on the intracellular level of Ca<sup>2+</sup> rather than of cAMP. *Life Sci* **67**, 2605-2613 (2000).
434. Yan, C., Takahashi, M., Okuda, M., Lee, J.D. & Berk, B.C. Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium. *J Biol Chem* **274**, 143-150 (1999).
435. Yanagisawa, M. & Masaki, T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 374-378 (1989).
436. Yang, C., Mwaikambo, B.R., Zhu, T., Gagnon, C., Lafleur, J., Seshadri, S., Lachapelle, P., Lavoie, J.-C., Chemtob, S. & Hardy, P. Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R467-476 (2008).
437. Yano, Y., Saito, Y., Narumiya, S. & Sumpio, B.E. Involvement of rho p21 in cyclic strain-induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK), morphological changes and migration of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **224**, 508-515 (1996).
438. Yano, Y., Shiba, E., Kambayashi, J., Sakon, M., Kawasaki, T., Fujitani, K., Kang, J. & Mori, T. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb Res* **71**, 385-396 (1993).
439. Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I.F., Bauer, M.P., Lin, M.I., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Stan, R.V. & Sessa, W.C. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest* **116**, 1284-1291 (2006).
440. Yuana, Y., Oosterkamp, T.H., Bahatyrova, S., Ashcroft, B., Garcia Rodriguez, P., Bertina, R.M. & Osanto, S. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost* **8**, 315-323 (2010).

441. Zalba, G., Beaumont, F.J., San Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M.A., Etayo, J.C. & Diez, J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**, 1055-1061 (2000).
442. Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Shah, A., Willeit, J. & Mayr, M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* **107**, 810-817 (2010).
443. Zebda, N., Dubrovskiy, O. & Birukov, K.G. Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. *Microvasc Res* **83**, 71-81 (2012).
444. Zeng, L., Zampetaki, A., Margariti, A., Pepe, A.E., Alam, S., Martin, D., Xiao, Q., Wang, W., Jin, Z.G., Cockerill, G., Mori, K., Li, Y.S., Hu, Y., Chien, S. & Xu, Q. Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8326-8331 (2009).
445. Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., Wang, S., Olson, E.N., Schober, A. & Weber, C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* **2**, ra81 (2009).
446. Zheng, W., Seftor, E.A., Meininger, C.J., Hendrix, M.J. & Tomanek, R.J. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H909-917 (2001).
447. Zwicker, J.I., Lacroix, R., Dignat-George, F., Furie, B.C. & Furie, B. Measurement of platelet microparticles. *Methods Mol Biol* **788**, 127-139 (2012).

# Annexes

## Curriculum vitae

Anne-Clémence VION

PhD student

INSERM U970, PARCC HEGP, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, F

Team 1: cellular and tissular markers in atherosclerosis

anne-clemence.vion@inserm.fr

DOB: 03/16/86 (Age 26)

Citizenship: french

4 rue Léon Delagrang, Esc. 7

75015 Paris, France

+336.75.65.44.20

## POST-DOCTORAL POSITION IN VASCULAR BIOLOGY END OF 2013

### EDUCATION

---

End of 2012      Thesis Defense (expected)

Nov2009 - Dec 2012      Doctoral Studies

**Subject: Cardiovascular biology**

**Project: Microparticles and endothelial shear stress**

**Supervisor: Dr Chantal Boulanger**

July 2009      **Biological engineer degree**, specialization “Conception and innovation of bio-product”

June 2004      scientific baccalaureate with honor

,

### SCIENTIFIC CONGRESS PARTICIPATION AND ABSTRACTS

---

July 2012      Gordon research conferences and seminar on Endothelial Cell Phenotypes in Health & Disease”, Seminar: **Oral communication**, Congress: **Poster presentation. Travel Award.**

Anne-Clémence Vion, Bhama Ramkhelawon, Xavier Loyer, Gilles Chironi, Cecile Devue, Alain Tedgui, Stéphanie Lehoux, Chantal M. Boulanger. **Shear stress regulates endothelial microparticle release**

April 2012      ATVB meeting, **Poster presentation.**

Vion AC, Ramkhelawon B, Loyer X, Chironi G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM. **Laminar shear stress decreases endothelial microparticles release by a Nitric Oxide- and ABCA1-dependent mechanism.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, April 17-20 (poster P208)

Sept. 2011      European Vascular Biology Meeting, **Oral communication.**

Vion, A.C., Ramkhelawon, B., Tedgui, A., Lehoux, S., Boulanger, C.M. (2011). **Low Shear Stress Releases Procoagulant Endothelial Microparticles by a Rho-Kinase and Erk1/2-MAPK- Dependent Mechanism.**

June 2011      ESC Basic Science Summer School (European Society of Cardiology), **Poster prize.**



**April 2011** ATVB meeting, **Poster presentation.**

Vion, A.C., Ramkhelawon, B., Tedgui, A., Lehoux, S., Boulanger, C.M. (2011). **P 243 Low Shear Stress Releases Procoagulant Endothelial Microparticles by a Rho-Kinase and Erk1/2-MAPK- Dependent Mechanism.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, April 28-30 (poster P243).

**April 2010-11** Participation to the French congress “Printemps de la Cardiologie”, **Poster presentations and oral communication.**

Vion, A.C., Ramkhelawon, B., Tedgui, A., Lehoux, S., Boulanger, C.M. (2011). **OC05-0039 Low shear stress release procoagulant endothelial microparticles by a RhoK and erk1/2-MAPK-dependent mechanism.** Archives of Cardiovascular Diseases Supplements 2, 1-91

Vion, A.C., Ramkhelawon, B., Tedgui, A., Boulanger, C.M. (2010) **PC10-0444 Shear stress induced-endothelial microparticles release: role of MAPK and NF-kB pathways.** Archive of cardiovascular diseases supplements 2, 1-90

## PROFESSIONAL EXPERIENCES / TRAINING

---

**2009** **Trainee engineer, company: Généthon**

(6 months)

bio-processes department, translational research

Subject: Titration and characterization of baculovirus by flow cytometry, chromatography (HPLC) and imaging.

**2007** **Trainee engineer, company: CIT (international center of toxicology).**

(6 months)

Subject: Validation of method and Improvement of the quality control in flow cytometry.

## COMPETENCES

---

### Cell culture

Endothelial cell lines, smooth muscle cell lines, monocytic cell lines, primary culture of EC extracted from mice, transfection, electroporation, flow experiments.

### Cellular biology

Western blot, ELISA, flow cytometry (cells, microparticles, virus), immunofluorescence, immunochemistry.

### Molecular biology

DNA, RNA and miRNA extraction, PCR, qPCR, plasmid amplification and purification, protein assay, cholesterol assay.

### Animals model

Transgenic lineage: Breeding, genotyping, injections, blood sample, blood pressure, sacrifice, organs taking and preservation.

## PUBLICATIONS

---

Vion AC, Ramkhelawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM. **Shear Stress Regulates Endothelial Microparticle Release.** (submitted)

Vion AC, Birukova AA, Boulanger CM, Birukov FG. **Pathological cyclic stretch stimulates microparticle generation by pulmonary endothelial cells through caspase-dependent, apoptosis-independent mechanism** (in press)

**Vion AC**, Boulanger CM. **Microvesicles and exosomes in health and diseases**. Book chapter, eds I. Sargent and P. Harrison. (in press)

Loyer X, Potteaux S, **Vion AC**, Guérin CL, Boulkroun S, Rautou PE, Ramkelaon B, Esposito B, Dalloz M, Paul JL, Julia P, Maccario J, Boulanger CM, Mallat Z, Tedgui A. **Inhibition of microRNA-92a Prevents Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis in mice**. (submitted)

Rautou PE, Bresson J, Sainte-Marie Y, **Vion AC**, Paradis V, Renard JM, Devue C, Heymes C, Letteron P, Elkrief L, Lebrec D, Valla D, Tedgui A, Moreau R, Boulanger CM. **Abnormal Plasma Microparticles Impair Vasoconstrictor Responses in Patients with Cirrhosis**. *Gastroenterology*. 2012 Jul;143(1):166-76.e6.

Rautou PE, **Vion AC**, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. **Microparticles, vascular function, and atherothrombosis**. *Circ Res*. 2011 Aug 19;109(5):593-606.

Rautou PE, Leroyer AS, Ramkelaon B, Devue C, Duflaut D, **Vion AC**, Nalbone G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM. **Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration**. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):335-43.

## STUDENTS SUPERVISION

---

supervision of 6 master degree students since 2009.

## ADDITIONAL INFORMATIONS

---

<b>Language:</b>	<b>English</b>	<b>Software:</b>	Microsoft Office	Photoshop
	Spanish		Graph pad Prism	Image J
			Flow-jo / DIVA / Expo32	

## REFERENCES

---

Dr Chantal BOULANGER - Dr Alain TEDGUI : References available upon request

## Résumé

Les microparticules sont des vésicules d'un diamètre compris entre 0,1 et 1 micromètre. Elles sont issues de la membrane plasmique de cellules activées ou en apoptose. Leur production met en jeu des mécanismes cellulaires multiples, dépendants du type cellulaire et du stimulus initial. Les taux de microparticules circulantes, en particulier de microparticules endothéliales, sont augmentés dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Plusieurs travaux identifient le taux de microparticules endothéliales plasmatiques comme un biomarqueur émergent, reflétant de la santé de l'endothélium. Cependant, les mécanismes régulant la production de microparticules endothéliales *in vivo* sont encore mal connus. Les contraintes mécaniques exercées par le sang circulant sont un déterminant majeur de la fonction endothéliale. Cependant, leur rôle sur la production de microparticules endothéliales reste encore inconnu à ce jour.

Mon travail de thèse a donc pour objectif d'identifier l'effet de facteurs mécaniques physiopathologiques comme l'étirement excessif ou les faibles contraintes de cisaillement sur la vésiculation endothéliale et de comprendre les mécanismes intracellulaires sous-jacents ainsi que leur impact sur la composition de ces microparticules.

Premièrement, nous avons montré que l'exposition à un étirement cyclique excessif conduit à une augmentation de la production de microparticules. Cette production est médiée par les caspases indépendamment de l'apoptose. Dans un deuxième travail, nous avons identifié les faibles contraintes de cisaillement comme stimuli pathophysiologique de la production de microparticules endothéliales. Nous avons démontré une relation inverse entre taux de cisaillement de l'artère brachiale et taux de microparticules endothéliales (CD144+) dans une cohorte de patients asymptomatiques de 74 sujets. Ensuite, l'étude *in vitro* des mécanismes intracellulaires a permis d'identifier l'activation de la voie RhoA-ROCK-ERK1/2 comme effecteur principal ainsi que l'expression augmentée d'ABCA1 dans des cellules endothéliales soumises à un faible cisaillement. Les microparticules ainsi produites expriment fortement ICAM-1 et ont un taux élevé de phosphatidylsérine à leur surface. Au contraire, de fortes contraintes de cisaillement préviennent cette vésiculation grâce à la production de NO qui favorise la stabilité de la membrane plasmique et diminue l'expression d'ABCA1. Ces microparticules expriment alors moins d'ICAM-1 et de phosphatidylsérine, et elles sont enrichies en miR-126. Enfin, dans un troisième travail, nous avons démontré que les microparticules isolées de la plaque d'athérosclérose humaine peuvent transférer ICAM-1 fonctionnellement actif aux cellules endothéliales cibles et augmenter le recrutement leucocytaire.

En conclusion, ce travail apporte des éléments nouveaux sur les mécanismes de production de microparticules endothéliales *in vivo* en identifiant pour la première fois les contraintes hémodynamiques comme déterminant essentiel de la vésiculation endothéliale. Nous montrons également que ces facteurs influencent directement la composition des microparticules en protéines et en microARN, suggérant des effets biologiques différents de ces microparticules en fonction du stimuli mécanique qui les produit.